

=> d bib abs

L1 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 2006 THE THOMSON CORP on STN

AN 2003-703023 [67] WPIDS Full-text

DNN N2003-561722 DNC C2003-194312

TI Marker for screening for compounds influencing a gene or protein, for treating cartilage disorders, such as, osteoarthritis, comprises a polynucleotide or a complement to specific genes, or an antibody to its protein.

DC B04 D16 S03

PA (SUMU) SUMITOMO SEIYAKU KK

CYC 1

PI JP 2003225093 A 20030812 (200367)* 64<--

ADT JP 2003225093 A JP 2002-348073 20021129

PRAI JP 2001-367993 20011130

AN 2003-703023 [67] WPIDS Full-text

AB JP2003225093 A UPAB: 20031017

NOVELTY - A marker for cartilage disorders consists of a polynucleotide sequence of 15 bases from the sequence of the acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1, Rev-Erba beta, Selenoprotein P, aquaporin 1, BMP-3b; FK506-binding protein 1A, apolipoprotein E, acyl-CoA synthetase 5, epoxide hydrolase 1, or glutamine synthase gene, and/or a polynucleotide complementary to one of these.

DETAILED DESCRIPTION - A marker for cartilage disorders consists of a polynucleotide sequence of 15 bases from the sequence of acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 gene, having a sequence of 1518 base pairs (bp); Rev-Erba beta gene, having a sequence of 2147 bp; Selenoprotein P gene, having a sequence of 2038 bp; aquaporin 1 gene having a sequence of 1662 bp; the BMP-3b gene having a sequence of 2674 bp; FK506-binding protein 1A gene having a sequence of 1532 bp; apolipoprotein E gene having a sequence of 1156 bp; acyl-CoA synthetase 5 gene having a sequence of 3366 bp; epoxide hydrolase 1 gene having a sequence of 1777 bp; glutamine synthase gene having a sequence of 1366 bp; and/or a polynucleotide complementary to one of these, where all the sequences are all given in the specification.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) a detection method of a cartilage disorder comprising:

(a) combining RNA from a sample from the subject or its complementary polynucleotide with the disease marker;

(b) determining the amount of this RNA or its complement, using the marker as label; and

(c) diagnosing disease based on the result;

(2) a disease marker for cartilage disease containing an antibody to the aminoacid (aa) sequence of acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1, having a sequence of 427 aa; Rev-Erba beta having a sequence of 579 aa; selenoprotein P having a sequence of 381 aa; aquaporin 1 having a sequence of 269 aa; BMP-3b having a sequence of 478 aa; FK506-binding protein 1A having a sequence of 108 aa; apolipoprotein E having a sequence of 317 aa; acyl-CoA synthetase 5 having a sequence of 683 aa; epoxide hydrolase 1 having a sequence of 455 aa; or glutamine synthase having a sequence of 373 aa, where all the sequences are given in the specification;

(3) a detection method as for (1) using a protein sample from the subject, or a peptide from it, and the antibody as a label;

(4) screening for a material which controls expression of one of the genes above by contacting a test material (A) and cells which can express the gene and determining whether (A) alters the amount of expression of the gene;

(5) screening for a material which controls the activity or function of one of the proteins by contacting (A) and a fraction obtained from cells expressing the gene, and determining whether (A) alters the activity of the protein;

(6) an agent to improve or treat cartilage disorder which contains a substance controlling expression of the genes or activity of the proteins.

ACTIVITY - Osteopathic; Antiarthritic.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-225093

(P2003-225093A)

(43) 公開日 平成15年8月12日 (2003.8.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 19/08	4 B 0 2 4
A 6 1 P 19/08		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/15	Z 4 C 0 8 4
G 0 1 N 33/15		33/50	Z 4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数50 O L (全 64 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-348073 (P2002-348073)

(22) 出願日 平成14年11月29日 (2002.11.29)

(31) 優先権主張番号 特願2001-367993 (P2001-367993)

(32) 優先日 平成13年11月30日 (2001.11.30)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 青木 幹雄

大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

(72) 発明者 原田 秀幸

大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二 (外8名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨障害マーカー及びその利用

(57) 【要約】

【課題】軟骨障害を反映する疾患マーカー、該疾患マーカーを利用した軟骨障害の検出方法、該障害の改善に有用な薬物のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び/またはそれに相補的なポリヌクレオチドを、軟骨障害の疾患マーカーとして利用する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に記載のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子の塩基配列、配列番号3に記載のRev-ErbA β 遺伝子の塩基配列、配列番号5に記載のSelenoprotein P遺伝子の塩基配列、配列番号7に記載のAquaporin 1遺伝子の塩基配列、配列番号9に記載のBMP-3b遺伝子の塩基配列、配列番号11に記載のFK506-binding protein 1A遺伝子の塩基配列、配列番号13に記載のApolipoprotein E遺伝子の塩基配列、配列番号15に記載のAcyl-CoA synthetase 5遺伝子の塩基配列、配列番号17に記載のEpoxide hydrolase 1遺伝子の塩基配列または配列番号19に記載のGlutamine synthase遺伝子の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び／またはそれに相補的なポリヌクレオチドからなる、軟骨障害の疾患マーカー。

【請求項2】 軟骨障害の検出においてプローブまたはプライマーとして使用される請求項1記載の疾患マーカー。

【請求項3】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、軟骨障害の検出方法：

(a) 被験者の生体試料から調製されたRNAまたはそれから転写された相補的なポリヌクレオチドと請求項1または2に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、

(b) 該疾患マーカーに特異的に結合した生体試料由来のRNAまたはそれから転写された相補的なポリヌクレオチドを、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、

(c) (b)の測定結果に基づいて、軟骨障害の罹患を判断する工程。

【請求項4】 配列番号2に記載のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1のアミノ酸配列、配列番号4に記載のRev-ErbA β のアミノ酸配列、配列番号6に記載のSelenoprotein Pのアミノ酸配列、配列番号8に記載のAquaporin 1のアミノ酸配列、配列番号10に記載のBMP-3bのアミノ酸配列、配列番号12に記載のFK506-binding protein 1Aのアミノ酸配列、配列番号14に記載のApolipoprotein Eのアミノ酸配列、配列番号16に記載のAcyl-CoA synthetase 5のアミノ酸配列、配列番号18に記載のEpoxide hydrolase 1のアミノ酸配列または配列番号20に記載のGlutamine synthaseのアミノ酸配列からなるタンパク質を認識する抗体を有する、軟骨障害の疾患マーカー。

【請求項5】 軟骨障害の検出においてプローブとして使用される請求項4記載の疾患マーカー。

【請求項6】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、軟骨障害の検出方法：

(a) 被験者の生体試料から調製されたタンパク質と請求項4または5に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、(b) 該疾患マーカーに結合した生体試料由来のタンパク質またはその部分ペプチドを、上記疾患マーカー

を指標として測定する工程、(c) (b)の測定結果に基づいて、軟骨障害の罹患を判断する工程。

【請求項7】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞の上記遺伝子の発現量と比較する工程、

(c) (b)の比較結果に基づいて、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現量を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項8】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、請求項7記載のRev-ErbA β 遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とRev-ErbA β 遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のRev-ErbA β 遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞の上記遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、Rev-ErbA β 遺伝子の発現量を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項9】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、請求項7記載のAquaporin 1遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とAquaporin 1遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のAquaporin 1遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のAquaporin 1遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、Aquaporin 1遺伝子の発現量を減少させる被験物質

を選択する工程。

【請求項10】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、請求項7記載のFK506-binding protein 1A遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) 被験物質とFK506-binding protein 1A遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のFK506-binding protein 1A遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のFK506-binding protein 1A遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、FK506-binding protein 1A遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【請求項11】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、請求項7記載のEpoxide hydrolase 1遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) 被験物質とEpoxide hydrolase 1遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のEpoxide hydrolase 1遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のEpoxide hydrolase 1遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、Epoxide hydrolase 1遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【請求項12】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、請求項7記載のGlutamine synthase遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) 被験物質とGlutamine synthase遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のGlutamine synthase遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のGlutamine synthase遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、Glutamine synthase遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【請求項13】 軟骨障害の改善または治療剤の有効成分を探索するための方法である、請求項7乃至12のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項14】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Seleno-

protein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能(活性)を測定し、該機能(活性)を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分の上記Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能(活性)と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能(活性)を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項15】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、請求項14記載のAquaporin 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) Aquaporin 1を含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のAquaporin 1由来の機能(活性)を測定し、該機能(活性)を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のAquaporin 1の機能(活性)と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のAquaporin 1の機能(活性)を抑制する被験物質を選択する工程。

【請求項16】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、請求項14記載のFK506-binding protein 1Aの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) FK506-binding protein 1Aを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のFK506-binding protein 1A由来の機能(活性)を測定し、該機能(活性)を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のFK506-binding protein 1Aの機能(活性)と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のFK506-binding protein 1Aの機能(活性)を抑制する被験物質を選択する工程。

【請求項17】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、請求項14記載のEpoxide hydrolase 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) Epoxide hydrolase 1を含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のEpoxide hydrolase 1由来の機能(活性)を測定し、該機能(活性)を被験物質を接触させな

い対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のEpoxide hydrolase 1の機能（活性）と比較する工程、(c)

(b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のEpoxide hydrolase 1の機能（活性）を抑制する被験物質を選択する工程。

【請求項18】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、請求項14記載のGlutamine synthaseの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Glutamine synthaseを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のGlutamine synthase由来の機能（活性）を測定し、該機能（活性）を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のGlutamine synthaseの機能（活性）と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のGlutamine synthaseの機能（活性）を抑制する被験物質を選択する工程。

【請求項19】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、acetoacetyl-CoA、CoAおよび被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase活性と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase活性を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項20】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Rev-ErbAβの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Rev-ErbAβを含みかつRORα1遺伝子及びROR応答性遺伝子を発現可能な細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞またはその細胞画分のROR応答性遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞またはその細胞画分のROR応答性遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞またはその細胞画分のROR応答性遺伝子の発現量を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項21】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Rev-ErbAβの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Rev-ErbAβ、ROR応答性領域含有ポリヌクレオチドおよび被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液の、Rev-ErbAβのROR応答性領域含有ポリヌクレオチドへの結合活性（Rev-ErbAβ結合活性）を測定し、該活性を被験物質を接触させない対

照水溶液のRev-ErbAβ結合活性と比較する工程、(c)

(b)の比較結果に基づいて、Rev-ErbAβ結合活性を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項22】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Selenoprotein Pの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Selenoprotein P、グルタチオン、グルタチオンレダクターゼ、NADPH、glutathione peroxidaseに対する基質および被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のglutathione peroxidase活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のglutathione peroxidase活性と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液のglutathione peroxidase活性を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項23】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Aquaporin 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Aquaporin 1を含む細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞またはその細胞画分の水透過性活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞またはその細胞画分の水透過性活性と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞またはその細胞画分の水透過性活性を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項24】 工程(c)における変動が抑制である、請求項23記載のAquaporin 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法。

【請求項25】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、BMP-3bの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) 未分化間葉系細胞又は前骨芽細胞およびBMP-3bを含む水溶液に被験物質を接触させて一定期間培養する工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液の上記細胞に由来するアルカリ性ホスファターゼ活性又はコラーゲン合成活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液の上記細胞由来のアルカリ性ホスファターゼ活性又はコラーゲン合成活性と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞由来のアルカリ性ホスファターゼ活性又はコラーゲン合成活性を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項26】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、FK506-binding protein 1Aの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) FK506-binding protein 1A、キモトリプシン、ペプチジルプロリルイソメラーゼとキモトリプシンの双方に対する基質および被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を測定し、該活性を被験物質を

接触させない対照水溶液のペプチジルプロリルイソメラーゼ活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記水溶液のペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項27】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、FK506-binding protein 1Aの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) FK506-binding protein 1A、FK506および被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液の、FK506のFK506-binding protein 1Aへの結合活性(FK506結合活性)を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のFK506結合活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記水溶液のFK506結合活性を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項28】 工程(c)における変動が抑制である、請求項26または27記載のFK506-binding protein 1Aの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法。

【請求項29】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Apolipoprotein Eの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Apolipoprotein E受容体を発現する細胞または該細胞から調製した細胞画分およびApolipoprotein Eを含む水溶液を被験物質と接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液における上記細胞またはその細胞画分のApolipoprotein E結合活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液における上記細胞またはその細胞画分のApolipoprotein E結合活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記細胞またはその細胞画分のApolipoprotein E結合活性を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項30】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Acyl-CoA synthetase 5の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Acyl-CoA synthetase 5、脂肪酸、CoAおよび被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のAcyl-CoA合成活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のAcyl-CoA合成活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記水溶液のAcyl-CoA合成活性を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項31】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Epoxide hydrolase 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Epoxide hydrolase 1、Epoxide hydrolase 1に対する基質および被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のEpoxide hydrolase 1活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のEpoxide hydrolase 1活性と比較する工程、(c)

(b) の比較結果に基づいて、上記水溶液のEpoxide hydrolase 1活性を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項32】 工程(c)における変動が抑制である、請求項31記載のEpoxide hydrolase 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法。

【請求項33】 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Glutamine synthaseの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Glutamine synthase、グルタミン酸 および被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のGlutamine synthase活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のGlutamine synthase活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記水溶液のGlutamine synthase活性を変動させる被験物質を選択する工程。

【請求項34】 工程(c)における変動が抑制である、請求項33記載のGlutamine synthaseの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法。

【請求項35】 軟骨障害の改善または治療剤の有効成分を探索するための方法である、請求項14乃至34のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項36】 Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現を制御する物質を有効成分とする軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項37】 Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現を制御する物質が請求項7乃至13のいずれかに記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項36記載の軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項38】 Aquaporin 1遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現を抑制する物質を有効成分とする、軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項39】 Aquaporin 1遺伝子の発現を抑制する物質が請求項9に記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項38記載の軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項40】 FK506-binding protein 1A遺伝子の発現を抑制する物質が請求項10に記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項38記載の軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項41】 Epoxide hydrolase 1遺伝子の発現を

抑制する物質が請求項11に記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項38記載の軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項42】 Glutamine synthase遺伝子の発現を抑制する物質が請求項12に記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項38記載の軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項43】 Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能（活性）制御物質を有効成分とする、軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項44】 Rev-ErbA β またはAquaporin 1の機能（活性）制御物質を有効成分とする、軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項45】 Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能（活性）制御物質が、請求項14乃至35のいずれかに記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項43記載の軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項46】 Aquaporin 1、FK506-binding protein 1A、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能（活性）抑制物質を有効成分とする、軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項47】 Aquaporin 1の機能（活性）を抑制する物質が請求項15または24に記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項46記載の軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項48】 FK506-binding protein 1Aの機能（活性）を抑制する物質が請求項16または28に記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項46記載の軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項49】 Epoxide hydrolase 1の機能（活性）を抑制する物質が請求項17または32に記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項46記載の軟骨障害の改善または治療剤。

【請求項50】 Glutamine synthaseの機能（活性）を抑制する物質が請求項18または34に記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項46記載の軟骨障害の改善または治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は軟骨障害の診断に有用な疾患マーカーに関する。より詳細には、本発明は軟骨障害、例えば変形性関節症や軟骨形成異常症、変形性椎間板症、軟骨の欠損、軟骨損傷、半月板損傷、あるいは

は骨折の修復・治癒不全等の疾患の遺伝子診断において、プライマーまたは検出プローブとして有効に利用できる疾患マーカーに関する。

【0002】また本発明は、上記疾患マーカーを利用して、軟骨障害を検出する方法（診断方法）、軟骨障害の改善または治療薬として有効な物質をスクリーニングする方法、および該スクリーニング方法によって得られる物質を有効成分とする軟骨障害の改善または治療薬に関する。

【0003】

【従来の技術】軟骨は軟骨細胞とこれを取り囲む基質からなる結合組織であり、関節、脊柱の椎間板、肋軟骨、耳介、外耳道、恥骨結合、咽頭蓋などに存在する。軟骨の作用としては、骨端の摩擦の低減（関節軟骨）、弾性の保持（耳介軟骨）、運動機能（肋軟骨、恥骨軟骨など）が知られており、軟骨は生体の機能維持の上で重要な作用を有している。従来から軟骨の障害に起因する種々の疾患が知られており、例えば、変形性関節症、軟骨形成異常症、変形性椎間板症、骨折の修復・治癒不全などが例示される。特に、高齢化社会の到来、スポーツによる外傷の増加、キーパンチャー病などに代表される職業病の出現などにより、軟骨障害患者は著しく増加しており、この領域における医療の進歩が要望されている。

【0004】従来から軟骨障害を治療するために種々の治療法が試みられてきているが、それらは直接的に原因の解消を目的とするものではなく、例えば、抗炎症剤を投与することにより、その疾患に基づく痛みなどの障害を抑制する方法、関節にヒアルロン酸製剤などを注入して関節の動きを潤滑にする方法など、対症療法的なものでしかなかった。また軟骨欠損に対する治療法として、軟骨細胞移植が行なわれているが、移植後のホスト側の軟骨基質との接着が不十分であり、治療法としての確立はなされていない。さらに軟骨細胞移植治療法は侵襲性であることから、患者への負担が大きく、また感染の可能性も否定できない。

【0005】以上のように軟骨障害の根治的治療法は見出されていないことから、特に患者数が多い変形性関節症などでは、その有効な治療剤、および当該治療剤探索のための新規なスクリーニング系の構築が期待されている。

【0006】また、最近の医療現場では、軟骨障害に限らず、個々の患者の症状に合わせて治療法を的確に選択することが望まれるようになってきている。高齢化社会でのQOL (Quality of life) 向上の必要性が認識されてきた近年では、特に、万人に共通した治療ではなく、個々の患者の症状に合わせて適切な治療が施されることが強く求められている。このような所謂テーラーメイド治療を行うためには、個々の疾患について患者の症状やその原因（遺伝的背景）を的確に反映する疾患マーカーが有用であり、その探索並びに開発を目指した研究が精力

的に行われているのが現状である。

【0007】なお、本発明において対象とするAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子(例えば、非特許文献1及び2参照)、Rev-ErbA β 遺伝子(例えば、非特許文献3及び4参照)、Selenoprotein P遺伝子(例えば、非特許文献5、6及び7参照)、Aquaporin 1遺伝子(例えば、非特許文献8及び9参照)、BMP-3b遺伝子(例えば、非特許文献10及び11参照)、FK506-binding protein 1A遺伝子(例えば、非特許文献12及び13参照)、Apolipoprotein E遺伝子(例えば、非特許文献14及び15参照)、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子(例えば、非特許文献16及び17参照)、Epoxide hydrolase 1遺伝子(例えば、非特許文献18及び19参照)、並びにGlutamine synthase遺伝子(例えば、非特許文献20及び21参照)は、それぞれ配列並びに取得方法のいずれも公知の遺伝子であり、またその発現産物であるタンパク質も公知になっている。

【0008】

【非特許文献1】GenBank Accession No. D90228

【0009】

【非特許文献2】ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(Journal of Clinical Investigation) 86, p.2086-2092 (1990)

【0010】

【非特許文献3】GenBank Accession No. D16815

【0011】

【非特許文献4】モレキュラー・エンドクリノロジー(Molecular Endocrinology) 8, p.996-1005 (1994)

【0012】

【非特許文献5】GenBank Accession No. Z11793

【0013】

【非特許文献6】プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスズ・オブ・ザ・ユナイティッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 90, p.537-41 (1993)

【0014】

【非特許文献7】ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry) 275 p.6288-94, (2000)

【0015】

【非特許文献8】GenBank Accession No. NM_000385

【0016】

【非特許文献9】プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスズ・オブ・ザ・ユナイティッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 88, p.11110-11114 (1991)

【0017】

【非特許文献10】GenBank Accession No. NM_004962

【0018】

【非特許文献11】バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochemical and Biophysical Research Communications) 223, p.304-310 (1996)

【0019】

【非特許文献12】GenBank Accession No. M34539

【0020】

【非特許文献13】プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスズ・オブ・ザ・ユナイティッド・ステイツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 87, p.5440-5443 (1990)

【0021】

【非特許文献14】GenBank Accession No. K00396

【0022】

【非特許文献15】ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry) 257 p.14639-14641 (1982)

【0023】

【非特許文献16】GenBank Accession No. NM_016234

【0024】

【非特許文献17】オンコジーン(Oncogene) 19, p.5919-5925 (2000)

【0025】

【非特許文献18】GenBank Accession No. L25879

【0026】

【非特許文献19】ヒューマン・モレキュラー・ゲネティックス(Human Molecular Genetics) 3, p.421-428 (1994)

【0027】

【非特許文献20】GenBank Accession No. Y00387

【0028】

【非特許文献21】ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research) 15, p.6293 (1987)

【0029】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、軟骨障害の診断に有用な疾患マーカーを提供することを目的とする。より詳細には、本発明は軟骨の障害に起因する疾患(軟骨障害)を特異的に反映した疾患マーカーを提供することを目的とする。さらに本発明は該疾患マーカーを利用した軟骨障害の検出方法(遺伝子診断方法)、該疾患の改善または治療に有用な薬物をスクリーニングする方法、並びに該疾患の改善または治療に有用な薬物を提供することを目的とする。

【0030】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行っていたところ、従来は変形性関節症等の軟骨障害との関連が知られていなかった以下の遺伝子: Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase

e 1遺伝子 (GenBank Accession No. D90228, J. Clin. Invest. 86, 2086-2092, 1990)、Rev-ErbA β 遺伝子 (GenBank Accession No. D16815, Molecular Endocrinology 8, 996-1005, 1994)、Selenoprotein P遺伝子 (GenBank Accession No. Z11793, Proc Natl Acad Sci 90:537-41, 1993)、Aquaporin 1遺伝子 (GenBank Accession No. NM_000385, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 11110-11114, 1991)、BMP-3b遺伝子 (GenBank Accession No. M004962, Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 304-310, 1996)、FK506-binding protein 1A遺伝子 (GenBank Accession No. M34539, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 5440-5443, 1990)、Apolipoprotein E遺伝子 (GenBank Accession No. K00396, J Biol Chem 257: 14639-14641, 1982)、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子 (GenBank Accession No. NM_016234, Oncogene, 19, 5919-5925, 2000)、Epoxide hydrolase 1遺伝子 (GenBank Accession No. L25879, Hum. Mol. Genet. 3, 421-428, 1994)、並びに Glutamine synthase 遺伝子 (GenBank Accession No. Y00387, Nucleic Acids Res. 15, 6293, 1987) が、軟骨障害のモデル動物であるラット十字靱帯切断モデルの障害軟骨において、正常軟骨と比較して有意に発現が上昇しており、しかもこれらの遺伝子は、ヒト軟骨障害患者の障害軟骨を含む膝関節組織においても、正常関節組織と比較して有意に発現上昇していることを見出した。さらにこれらの遺伝子は、病態の進行に伴って発現増大挙動を示すことも見出した。これらの知見から、本発明者らは、かかる遺伝子を軟骨障害の疾患マーカーとすることができ、またこれらの遺伝子を標的とすることにより軟骨障害を伴う疾患を緩和、抑制する治療薬の候補物質をスクリーニングすることが可能であるとの確信を得た。本発明はかかる知見を基礎として完成するに至ったものである。

【0031】すなわち、本発明は、下記に掲げるものである：

項1. 配列番号1に記載のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子の塩基配列、配列番号3に記載のRev-ErbA β 遺伝子の塩基配列、配列番号5に記載のSelenoprotein P遺伝子の塩基配列、配列番号7に記載のAquaporin 1遺伝子の塩基配列、配列番号9に記載のBMP-3b遺伝子の塩基配列、配列番号11に記載のFK506-binding protein 1A遺伝子の塩基配列、配列番号13に記載のApolipoprotein E遺伝子の塩基配列、配列番号15に記載のAcyl-CoA synthetase 5遺伝子の塩基配列、配列番号17に記載のEpoxide hydrolase 1遺伝子の塩基配列または配列番号19に記載のGlutamine synthase遺伝子の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び／またはそれに相補的なポリヌクレオチドからなる、軟骨障害の疾患マーカー。

項2. 軟骨障害の検出においてプローブまたはプライマーとして使用される項1記載の疾患マーカー。

項3. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、軟骨障害の検出方法：

(a) 被験者の生体試料から調製されたRNAまたはそれから転写された相補的なポリヌクレオチドと項1または2に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、(b) 該疾患マーカーに特異的に結合した生体試料由来のRNAまたはそれから転写された相補的なポリヌクレオチドを、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、(c) (b)の測定結果に基づいて、軟骨障害の罹患を判断する工程。

項4. 配列番号2に記載のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1のアミノ酸配列、配列番号4に記載のRev-ErbA β のアミノ酸配列、配列番号6に記載のSelenoprotein Pのアミノ酸配列、配列番号8に記載のAquaporin 1のアミノ酸配列、配列番号10に記載のBMP-3bのアミノ酸配列、配列番号12に記載のFK506-binding protein 1Aのアミノ酸配列、配列番号14に記載のApolipoprotein Eのアミノ酸配列、配列番号16に記載のAcyl-CoA synthetase 5のアミノ酸配列、配列番号18に記載のEpoxide hydrolase 1のアミノ酸配列または配列番号20に記載のGlutamine synthaseのアミノ酸配列からなるタンパク質を認識する抗体を有する、軟骨障害の疾患マーカー。

項5. 軟骨障害の検出においてプローブとして使用される項4記載の疾患マーカー。

【0032】項6. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、軟骨障害の検出方法：

(a) 被験者の生体試料から調製されたタンパク質と項4または5に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、(b) 該疾患マーカーに結合した生体試料由来のタンパク質またはその部分ペプチドを、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、(c) (b)の測定結果に基づいて、軟骨障害の罹患を判断する工程。

【0033】項7. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、

BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞の上記遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現量を変動させる被験物質を選択する工程。

項8. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、項7記載のRev-ErbA β 遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) 被験物質とRev-ErbA β 遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のRev-ErbA β 遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞の上記遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、Rev-ErbA β 遺伝子の発現量を変動させる被験物質を選択する工程。

項9. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、項7記載のAquaporin 1遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) 被験物質とAquaporin 1遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のAquaporin 1遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のAquaporin 1遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、Aquaporin 1遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

項10. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、項7記載のFK506-binding protein 1A遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) 被験物質とFK506-binding protein 1A遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のFK506-binding protein 1A遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のFK506-binding protein 1A遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、FK506-binding protein 1A遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【0034】項11. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、項7記載のEpoxide hydrolase 1遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) 被験物質とEpoxide hydrolase 1遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のEpoxide hydrolase 1遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のEpox

ide hydrolase 1遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、Epoxide hydrolase 1遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

項12. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、項7記載のGlutamine synthase遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) 被験物質とGlutamine synthase遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のGlutamine synthase遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のGlutamine synthase遺伝子の発現量と比較する工程、(c)

(b) の比較結果に基づいて、Glutamine synthase遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

項13. 軟骨障害の改善または治療剤の有効成分を探索するための方法である、項7乃至12のいずれかに記載のスクリーニング方法。

項14. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法:

(a) Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthase由来の機能(活性)を測定し、該機能(活性)を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分の上記Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能(活性)と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能(活性)を変動させる被験物質を選択する工程。

項15. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、項14記載のAquaporin 1の機能または活性を制御

する物質のスクリーニング方法：

(a) Aquaporin 1を含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、
(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のAquaporin 1由来の機能(活性)を測定し、該機能(活性)を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のAquaporin 1の機能(活性)と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のAquaporin 1の機能(活性)を抑制する被験物質を選択する工程。

【0035】項16. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、項14記載のFK506-binding protein 1Aの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) FK506-binding protein 1Aを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のFK506-binding protein 1A由来の機能(活性)を測定し、該機能(活性)を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のFK506-binding protein 1Aの機能(活性)と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のFK506-binding protein 1Aの機能(活性)を抑制する被験物質を選択する工程。

項17. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、項14記載のEpoxide hydrolase 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Epoxide hydrolase 1を含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のEpoxide hydrolase 1由来の機能(活性)を測定し、該機能(活性)を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のEpoxide hydrolase 1の機能(活性)と比較する工程、(c)

(b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のEpoxide hydrolase 1の機能(活性)を抑制する被験物質を選択する工程。

項18. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、項14記載のGlutamine synthaseの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Glutamine synthaseを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のGlutamine synthase由来の機能(活性)を測定し、該機能(活性)を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のGlutamine synthaseの機能(活性)と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のGlutamine synthaseの機能(活性)を抑制する被験物質を選択する工程。

項19. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1, acetoacetyl-CoA, CoAおよび被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase活性と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase活性を変動させる被験物質を選択する工程。

項20. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Rev-ErbA β の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Rev-ErbA β を含みかつROR α 1遺伝子及びROR応答性遺伝子を発現可能な細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞またはその細胞画分のROR応答性遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞またはその細胞画分のROR応答性遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞またはその細胞画分のROR応答性遺伝子の発現量を変動させる被験物質を選択する工程。

項21. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Rev-ErbA β の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Rev-ErbA β 、ROR応答性領域含有ポリヌクレオチドおよび被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液の、Rev-ErbA β のROR応答性領域含有ポリヌクレオチドへの結合活性(Rev-ErbA β 結合活性)を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のRev-ErbA β 結合活性と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、Rev-ErbA β 結合活性を変動させる被験物質を選択する工程。

項22. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Selenoprotein Pの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Selenoprotein P、グルタチオン、グルタチオンレダクターゼ、NADPH、glutathione peroxidaseに対する基質および被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のglutathione peroxidase活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のglutathione peroxidase活性と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液のglutathione peroxidase活性を変動させる被験物質を選択する工程。

項23. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Aquaporin 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Aquaporin 1を含む細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞またはその細胞画分の水透過性活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞またはその細胞画分の水透過性活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記細胞またはその細胞画分の水透過性活性を変動させる被験物質を選択する工程。

項24. 工程(c)における変動が抑制である、項23記載のAquaporin 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法。

項25. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、BMP-3bの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) 未分化間葉系細胞又は前骨芽細胞およびBMP-3bを含む水溶液に被験物質を接触させて一定期間培養する工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液の上記細胞に由来するアルカリ性ホスファターゼ活性又はコラーゲン合成活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液の上記細胞由来のアルカリ性ホスファターゼ活性又はコラーゲン合成活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記細胞由来のアルカリ性ホスファターゼ活性又はコラーゲン合成活性を変動させる被験物質を選択する工程。

項26. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、FK506-binding protein 1Aの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) FK506-binding protein 1A、キモトリプシン、ペプチジルプロリルイソメラーゼとキモトリプシンの双方に対する基質および被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のペプチジルプロリルイソメラーゼ活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記水溶液のペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を変動させる被験物質を選択する工程。

項27. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、FK506-binding protein 1Aの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) FK506-binding protein 1A、FK506および被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のFK506のFK506-binding protein 1Aへの結合活性(FK506結合活性)を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のFK506結合活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記水溶液のFK506結合活性を変動させる被験物質を選択する工程。

項28. 工程(c)における変動が抑制である、項26または27記載のFK506-binding protein 1Aの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法。

項29. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Apolipoprotein Eの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Apolipoprotein E受容体を発現する細胞または該細胞から調製した細胞画分およびApolipoprotein Eを含む水溶液を被験物質と接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液における上記細胞またはその細胞画分のApolipoprotein E結合活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液における上記細胞またはその細胞画分のApolipoprotein E結合活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記細胞またはその細胞画分のApolipoprotein E結合活性を変動させる被験物質を選択する工程。

項30. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Acyl-CoA synthetase5の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Acyl-CoA synthetase 5、脂肪酸、CoAおよび被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のAcyl-CoA合成活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のAcyl-CoA合成活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記水溶液のAcyl-CoA合成活性を変動させる被験物質を選択する工程。

項31. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Epoxide hydrolase 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Epoxide hydrolase 1、Epoxide hydrolase 1に対する基質および被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のEpoxide hydrolase活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のEpoxide hydrolase活性と比較する工程、(c)

(b) の比較結果に基づいて、上記水溶液のEpoxide hydrolase活性を変動させる被験物質を選択する工程。

項32. 工程(c)における変動が抑制である、項31記載のEpoxide hydrolase 1の機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法。

項33. 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Glutamine synthaseの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法：

(a) Glutamine synthase、グルタミン酸 および被験物質を水溶液中で接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液のGlutamine synthase活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のGlutamine synthase活性と比較する工程、(c) (b) の比較結果に基づいて、上記水溶液のGlutamine synthase活性を変動させる被験物質を選択する工程。

項34. 工程(c)における変動が抑制である、項33記載のGlutamine synthaseの機能または活性を制御する物質のスクリーニング方法。

項35. 軟骨障害の改善または治療剤の有効成分を採

索するための方法である、項14乃至34のいずれかに記載のスクリーニング方法。

項36. Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現を制御する物質を有効成分とする軟骨障害の改善または治療剤。

項37. Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現を制御する物質が項7乃至13のいずれかに記載のスクリーニング法により得られるものである、項36記載の軟骨障害の改善または治療剤。

項38. Aquaporin 1遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現を抑制する物質を有効成分とする、軟骨障害の改善または治療剤。

項39. Aquaporin 1遺伝子の発現を抑制する物質が項9に記載のスクリーニング法により得られるものである、項38記載の軟骨障害の改善または治療剤。

項40. FK506-binding protein 1A遺伝子の発現を抑制する物質が項10に記載のスクリーニング法により得られるものである、項38記載の軟骨障害の改善または治療剤。

項41. Epoxide hydrolase 1遺伝子の発現を抑制する物質が項11に記載のスクリーニング法により得られるものである、項38記載の軟骨障害の改善または治療剤。

項42. Glutamine synthase遺伝子の発現を抑制する物質が項12に記載のスクリーニング法により得られるものである、項38記載の軟骨障害の改善または治療剤。

項43. Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能(活性)制御物質を有効成分とする、軟骨障害の改善または治療剤。

項44. Rev-ErbA β またはAquaporin 1の機能(活性)制御物質を有効成分とする、軟骨障害の改善または治療剤。

項45. Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine

synthaseの機能(活性)制御物質が、項14乃至35のいずれかに記載のスクリーニング法により得られるものである、項43記載の軟骨障害の改善または治療剤。

項46. Aquaporin 1、FK506-binding protein 1A、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能(活性)抑制物質を有効成分とする、軟骨障害の改善または治療剤。

項47. Aquaporin 1の機能(活性)を抑制する物質が項15または24に記載のスクリーニング法により得られるものである、項46記載の軟骨障害の改善または治療剤。

項48. FK506-binding protein 1Aの機能(活性)を抑制する物質が項16または28に記載のスクリーニング法により得られるものである、項46記載の軟骨障害の改善または治療剤。

項49. Epoxide hydrolase 1の機能(活性)を抑制する物質が項17または32に記載のスクリーニング法により得られるものである、項46記載の軟骨障害の改善または治療剤。

項50. Glutamine synthaseの機能(活性)を抑制する物質が項18または34に記載のスクリーニング法により得られるものである、項46記載の軟骨障害の改善または治療剤。

【0036】

【発明の実施の形態】以下、本明細書において、アミノ酸、(ポリ)ペプチド、(ポリ)ヌクレオチドなどの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定〔IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)〕、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(日本国特許庁編)、および当該分野における慣用記号に従う。

【0037】本明細書において「遺伝子」または「DNA」とは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAを包含する趣旨で用いられる。またその長さによって特に制限されるものではない。従って、本明細書において遺伝子(DNA)とは、特に言及しない限り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNAおよびcDNAを含む1本鎖DNA(正鎖)並びに該正鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA(相補鎖)、およびこれらの断片のいずれもが含まれる。また当該「遺伝子」または「DNA」には、特定の塩基配列(配列番号:1,3,5,7,9,11,13,15,17,19)で示される「遺伝子」または「DNA」だけでなく、これらによりコードされるタンパク質と生物学的機能が同等であるタンパク質(例えば、同族体(ホモログ)、変異体及び誘導体など)をコードする「遺伝子」または「DNA」が包含される。かかる同族体、変異体または誘導体をコードする「遺伝子」または「DNA」としては、具体的には、後述の(1-1)項に記載のストリンジェントな条件下

で、前記の配列番号：1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19で示される特定塩基配列の相補配列とハイブリダイズする塩基配列からなる「遺伝子」または「DNA」を挙げることができる。

【0038】例えばヒト由来のタンパク質の同族体をコードする遺伝子（ホモログ）としては、当該タンパク質をコードするヒト遺伝子に対応するマウスやラットなど他生物種の遺伝子が例示できる。これらの遺伝子（ホモログ）は、HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>) により同定することができる。当該遺伝子（ホモログ）は、具体的には、例えば下記のようにして取得することができる：特定のヒト遺伝子の塩基配列をBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) にかけて一致する（Scoreが最も高く、E-valueが0でかつIdentityが100%を示す）配列のアクセッション番号を取得する。そのアクセッション番号をUniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) に入力して得られたUniGene Cluster ID (Hs.で示す番号) をHomoloGeneに入力する。結果として得られた他生物種遺伝子とヒト遺伝子との遺伝子ホモログの相関を示したリストから、特定の塩基配列で示されるヒト遺伝子に対応する遺伝子（ホモログ）としてマウスやラットなど他生物種の遺伝子を選抜する。

【0039】なお、遺伝子またはDNAは、機能領域の別を問うものではなく、例えば発現制御領域、コード領域、エキソン、またはイントロンを含むことができる。

【0040】本明細書において「ポリヌクレオチド」とは、RNAおよびDNAのいずれをも包含する趣旨で用いられる。なお、上記DNAには、cDNA、ゲノムDNA、及び合成DNAのいずれもが含まれる。また上記RNAには、total RNA、mRNA、rRNA、及び合成のRNAのいずれもが含まれる。

【0041】本明細書において「タンパク質」または「（ポリ）ペプチド」には、特定のアミノ酸配列で示される「タンパク質」または「（ポリ）ペプチド」だけでなく、これらと生物学的機能が同等であることを限度として、その断片、同族体（ホモログ）、誘導体、および変異体が包含される。ここで同族体（ホモログ）としては、ヒトのタンパク質に対応するマウスやラットなど他生物種のタンパク質が例示でき、これらはHomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>) により同定された遺伝子の塩基配列から演繹的に同定することができる。また変異体には、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、及び人為的に欠失、置換、付加および挿入されることによって改変されたアミノ酸配列を有する変異体が包含される。なお、上記変異体としては、変異のないタンパク質または（ポリ）ペプチドと、アミノ酸配列が少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらに好ましくは97%

相同なものを挙げることができる。

【0042】本明細書でいう「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、またはFabフラグメントやFab発現ライブラリーによって生成されるフラグメントなどのように抗原結合性を有する上記抗体の一部が包含される。

【0043】さらに本明細書において「疾患マーカー」とは、軟骨障害の罹患の有無若しくは罹患の程度を診断するために、また軟骨障害の改善または治療に有用な候補物質をスクリーニングするために、直接または間接的に利用されるものである。これには、例えば軟骨の障害に関連して生体内での発現が変動する遺伝子またはタンパク質を特異的に認識し、また結合することのできるヌクレオチド（オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドが含まれる）または抗体が包含される。これらの（ポリ）（オリゴ）ヌクレオチドおよび抗体は、上記性質に基づいて、生体内で発現した上記遺伝子及びタンパク質を検出するためのプローブとして、また（オリゴ）ヌクレオチドは生体内で発現した上記遺伝子を増幅するためのプライマーとして有効に利用することができる。

【0044】さらに本明細書において「関節／軟骨組織」とは、具体的には関節軟骨組織や関節滑膜組織のみならずこれら組織の周辺に存在する血液・滑液などを意味するものであり、特に言及しない限り、本明細書において「関節／軟骨組織」とは上記組織および血液・滑液などの総称として用いられる。

【0045】本発明は、前述するように、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子（以下まとめて本発明遺伝子ともいう）が、軟骨障害に罹患した患者及び動物の障害軟骨組織で、正常軟骨組織と比較して有意に発現上昇しており、またこれらの遺伝子が病態の進行に伴って発現増大挙動を示すことを見出したことに基づくものである。従って、これらの遺伝子及びその発現産物〔タンパク質、（ポリ）（オリゴ）ペプチド〕並びにそれらの派生物（例えば、抗体など）は、軟骨障害の解明、診断、予防及び治療に有効に利用することができ、かかる利用によって医学並びに臨床学上、有用な情報や手段を得ることができる。また、これらの遺伝子及びその発現産物並びにそれらからの派生物（例えば、抗体など）は、上記軟骨障害の治療、並びに該治療に有効に用いられる薬剤の開発に好適に利用することができる。さらに、個体または関節／軟骨組織における、上記遺伝子の発現またはその発現産物の検出、または該遺伝子の変異またはその発現不全の検出は、軟骨障害の解明や診断に有効に利用することができる。

【0046】以下、これらの本発明遺伝子、並びにその

発現産物 (Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthase、以下まとめて本発明タンパク質ともいう) やそれらの派生物について、具体的な用途を説明する。

【0047】(1) 軟骨障害の疾患マーカー及びその応用

(1-1) ポリヌクレオチド

本発明の配列番号1に示すポリヌクレオチドは、ヒト由来のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子として公知の遺伝子であり (GenBank Accession No. D90228)、この取得方法についても J. Clin. Invest. 86, 2086-2092, 1990に記載されるように公知である。

【0048】本発明の配列番号3に示すポリヌクレオチドは、ヒト由来のRev-ErbA β 遺伝子として公知の遺伝子であり (GenBank Accession No. D16815)、この取得方法についても Molecular Endocrinology 8: 996-1005, 1994に記載されるように公知である。

【0049】本発明の配列番号5に示すポリヌクレオチドは、ヒト由来のSelenoprotein P遺伝子として公知の遺伝子であり (GenBank Accession No. Z11793)、この取得方法についても Proc Natl Acad Sci 90:537-41, 1993に記載されるように公知である。

【0050】本発明の配列番号7に示すポリヌクレオチドは、ヒト由来のAquaporin 1遺伝子として公知の遺伝子であり (GenBank Accession No. NM_000385)、この取得方法についても Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 11110-11114, 1991に記載されるように公知である。

【0051】本発明の配列番号9に示すポリヌクレオチドは、ヒト由来のBMP-3b遺伝子として公知の遺伝子であり (GenBank Accession No. NM_004962)、この取得方法についても Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 304-310, 1996に記載されるように公知である。

【0052】本発明の配列番号11に示すポリヌクレオチドは、ヒト由来のFK506-binding protein 1A遺伝子として公知の遺伝子であり (GenBank Accession No. M34539)、この取得方法についても Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 5440-5443, 1990に記載されるように公知である。

【0053】本発明の配列番号13に示すポリヌクレオチドは、ヒト由来のApolipoprotein E遺伝子として公知の遺伝子であり (GenBank Accession No. K00396)、この取得方法についても J Biol Chem 257: 14639-14641, 1982に記載されるように公知である。

【0054】本発明の配列番号15に示すポリヌクレオチドは、ヒト由来のAcyl-CoA synthetase 5遺伝子として公知の遺伝子であり (GenBank Accession No. NM_016234)、この取得方法についても Oncogene, 19, 5919-5925, 2000に記載されるように公知である。

【0055】本発明の配列番号17に示すポリヌクレオチドは、ヒト由来のEpoxide hydrolase 1遺伝子として公知の遺伝子であり (GenBank Accession No. L25879)、この取得方法についても Hum. Mol. Genet. 3, 421-428, 1994に記載されるように公知である。

【0056】本発明の配列番号19に示すポリヌクレオチドは、ヒト由来のGlutamine synthase遺伝子として公知の遺伝子であり (GenBank Accession No. Y00387)、この取得方法についても Nucleic Acids Res. 15, 6293, 1987に記載されるように公知である。

【0057】本発明は、前述するように、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子 (本発明遺伝子) が、軟骨障害に罹患した患者及び動物の障害軟骨組織において、正常軟骨組織と比較して有意に発現上昇しており、しかも病態の進行に伴ってその発現量が増大するという知見を発端に、これらの遺伝子発現の有無や発現の程度を検出することによって上記軟骨障害の罹患の有無や罹患の程度が特異的に検出でき、該疾患の診断を正確に行うことができるという発想に基づくものである。

【0058】上記ポリヌクレオチドは、被験者が軟骨障害に罹患しているか否かまたはその罹患の程度を診断するためのツール (疾患マーカー) として有用である。具体的には、当該ポリヌクレオチド (疾患マーカー) は、被験者における本発明遺伝子の発現の有無またはその程度 (発現量) の検出に使用される。

【0059】また上記ポリヌクレオチドは、後述の(3-1)項に記載するような軟骨障害の改善または治療に有用な候補物質のスクリーニングにおいて、本発明遺伝子の発現変動を検出するためのスクリーニングツール (疾患マーカー) としても有用である。

【0060】かかる本発明の疾患マーカーは、配列番号1に記載のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子の塩基配列、配列番号3に記載のRev-ErbA β 遺伝子の塩基配列、配列番号5に記載のSelenoprotein P遺伝子の塩基配列、配列番号7に記載のAquaporin 1遺伝子の塩基配列、配列番号9に記載のBMP-3b遺伝子の塩基配列、配列番号11に記載のFK506-binding protein 1A遺伝子の塩基配列、配列番号13に記載のApolipoprotein E遺伝子の塩基配列、配列番号15に記載のAcyl-CoA synthetase 5遺伝子の塩基配列、配列番号17に記載のEpoxide hydrolase 1遺伝子の塩基配列または配列番号19に記載のGlutamine synthase遺伝子の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び/またはそれに相補的なポリヌクレオチドからなることを特徴とするものである。

【0061】ここで相補的なポリヌクレオチド（相補鎖、逆鎖）とは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17または19に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドの全長配列、または該塩基配列において少なくとも連続した15塩基長の塩基配列を有するその部分配列（ここでは便宜上、これらを「正鎖」ともいう）に対して、A:TおよびG:Cといった塩基対関係に基づいて、塩基的に相補的な関係にあるポリヌクレオチドを意味するものである。ただし、かかる相補鎖は、対象とする正鎖の塩基配列と完全に相補配列を形成する場合に限らず、対象とする正鎖とストリンジェントな条件でハイブリダイスすることができる程度の相補関係を有するものであってもよい。なお、ここでストリンジェントな条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) に教示されるように、複合体或いはプローブを結合する核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイス後の洗浄条件として、通常「 $1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 37°C 」程度の条件を挙げることができる。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイス状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイス条件として「 $0.5\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 42°C 」程度、さらに厳しいハイブリダイス条件として「 $0.1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 65°C 」程度の洗浄条件を挙げることができる。具体的には、このような相補鎖として、対象の正鎖の塩基配列と完全に相補的な関係にある塩基配列からなる鎖、並びに該鎖と少なくとも90%、好ましくは95%の相同性を有する塩基配列からなる鎖を例示することができる。

【0062】また、正鎖側のポリヌクレオチドには、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17または19に記載の塩基配列またはその部分配列を有するものだけでなく、上記相補鎖の塩基配列に対してさらに相補的な関係にある塩基配列からなる鎖を含めることができる。

【0063】さらに上記正鎖のポリヌクレオチド及び相補鎖（逆鎖）のポリヌクレオチドは、各々一本鎖の形態で疾患マーカーとして使用されても、また二本鎖の形態で疾患マーカーとして使用されてもよい。

【0064】本発明の軟骨障害の疾患マーカーは、具体的にはAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子の塩基配列に関する配列番号1、Rev-ErbA β 遺伝子の塩基配列に関する配列番号3、Selenoprotein P遺伝子の塩基配列に関する配列番号5、Aquaporin 1遺伝子の塩基配列に関する配列番号7、BMP-3b遺伝子の塩基配列に関する配列番号9、FK506-binding protein 1A遺伝子の塩基配列に関する配列番号11、Apolipoprotein E遺伝子の塩基配列に関する配列番号13、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子の塩基配列に関する配列番号15、Epoxide hydrolase 1遺伝子の塩基配列に関する配列番号17、または

Glutamine synthase遺伝子の塩基配列に関する配列番号19に記載される塩基配列（全長配列）からなるポリヌクレオチドであってもよいし、その相補配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。また、前記各配列番号で示される本発明遺伝子もしくは該遺伝子に由来するポリヌクレオチドを選択的に（特異的に）認識するものであれば、上記全長配列若しくはその相補配列の部分配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。この場合、上記全長配列またはその相補配列の塩基配列から任意に選択される少なくとも15個の連続した塩基長を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0065】なお、ここで「選択的に（特異的に）認識する」とは、例えばノーザンブロット法を用いた場合は、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子、Glutamine synthase遺伝子またはこれらに由来するポリヌクレオチドが特異的に検出できること、またRT-PCR法を用いた場合は、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子、Glutamine synthase遺伝子またはこれらに由来するポリヌクレオチドが特異的に生成されることを意味するが、それに限定されことなく、当業者が上記検出物または生成物がこれらの遺伝子に由来するものであると判断できるものであればよい。

【0066】そのような本発明の疾患マーカーは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17または19で示される本発明遺伝子の塩基配列をもとに、例えばprimer 3（HYPERLINK <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi> <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>）あるいはベクターNTI（Infomax社製）を利用して設計することができる。

【0067】具体的にはAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の塩基配列をprimer 3またはベクターNTIのソフトウェアにかけて得られる、プライマーまたはプローブの候補配列、若しくは少なくとも該配列を一部に含む配列をプライマーまたはプローブとして使用することができる。

【0068】本発明で用いる疾患マーカーは、上述するように連続する少なくとも15塩基の長さを有するものであればよいが、具体的にはマーカーの用途に応じて、長

さを適宜選択し設定することができる。

【0069】本発明において軟骨障害の検出（診断）は、被験者の生体組織、特に関節／軟骨組織における、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の少なくとも1つの発現の有無または発現レベル（発現量）を評価することによって行われる。この場合、上記本発明の疾患マーカーは、上記遺伝子の発現によって生じたRNAまたはそれに由来するポリヌクレオチドを特異的に認識し増幅するためのプライマーとして、または該RNAまたはそれに由来するポリヌクレオチドを特異的に検出するためのプローブとして利用することができる。

【0070】上記疾患マーカーを軟骨障害の検出（遺伝子診断）においてプライマーとして用いる場合には、通常15bp～100bp、好ましくは15bp～50bp、より好ましくは15bp～35bpの塩基長を有するものが例示できる。また検出プローブとして用いる場合には、通常15bp～全配列の塩基数、好ましくは15bp～1kb、より好ましくは100bp～1kbの塩基長を有するものが例示できる。

【0071】本発明の疾患マーカーは、ノーザンブロット法、RT-PCR法、in situハイブリダイゼーション法などといった、特定遺伝子を特異的に検出する公知の方法において、常法に従ってプライマーまたはプローブとして利用することができ、これによって軟骨障害に関連するAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現の有無または発現レベル（発現量）を評価することができる。なお、測定対象試料としては、使用する検出方法の種類や目的に応じて、被験者の関節／軟骨組織、例えば関節軟骨組織や関節滑膜組織の一部をバイオプシ等で採取するか、若しくはこれらの組織周辺の血液・滑液を採取することによって体外に取り出した生体試料から常法に従って調製したtotal RNAを用いてもよいし、さらに該RNAをもとにして調製される各種のポリヌクレオチドを用いてもよい。

【0072】また、生体組織における本発明遺伝子の遺伝子発現レベルは、DNAチップを利用して検出あるいは定量することもできる。この場合、本発明の疾患マーカーは当該DNAチップのプローブとして使用することができる（例えば、Affymetrix社のGene Chip Human Genome U95 A,B,C,D,Eの場合、25bpの長さのポリヌクレオチドプローブとして用いられる）。かかるDNAチップを、生体組織から採取したRNAをもとに調製される標識DNAまた

は標識RNAとハイブリダイズさせて、ハイブリダイズによって形成されたチップ上の上記プローブ（疾患マーカー）と標識DNAまたは標識RNAとの複合体を、該標識DNAまたは標識RNAの標識を指標として検出することにより、生体組織中での本発明遺伝子の発現の有無または発現レベル（発現量）が評価できる。

【0073】本発明の疾患マーカーは、軟骨障害の検出や診断（罹患の有無や罹患の程度の診断）に有用である。具体的には、該疾患マーカーを利用した軟骨障害の診断は、被験者の関節／軟骨組織と正常者の関節／軟骨組織（いずれも採取された組織を含む。以下、同じ）におけるAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の遺伝子発現レベルの違いを判定することによって行うことができる。この場合、遺伝子発現レベルの違いには、発現のある／なしの違いだけでなく、被験者の関節／軟骨組織と正常者の関節／軟骨組織の両者ともに発現がある場合でも、両者間の発現量の格差が1.5倍以上、好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上ある場合が含まれる。具体的にはAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子は軟骨障害で発現誘導（増大）を示すので、被験者の関節／軟骨組織で特異的に発現しているか、あるいは該発現量が正常な関節／軟骨組織の発現量と比べて1.5倍以上、好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上多ければ、被験者について軟骨障害の罹患が疑われる。

【0074】とりわけ、配列番号：9の塩基配列を有するBMP-3b遺伝子、および配列番号：17の塩基配列を有するEpoxide hydrolase 1遺伝子は、軟骨障害患者の障害軟骨を含む膝関節組織で、正常な膝関節組織に比べて10倍以上の発現増大を示していた。従って、配列番号：9若しくは配列番号：17の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基長を有するポリヌクレオチド/またはそれに相補的なポリヌクレオチドからなる本発明の疾患マーカーが特に有効である。

【0075】本発明において軟骨障害の検出（診断）は、被験者の生体組織、特に関節／軟骨組織における配列番号：1,3,5,7,9,11,13,15,17または19の塩基配列を有する本発明遺伝子の少なくとも1つの発現の有無または発現レベル（発現量）を評価することによって行われる。検出（診断）の精度や正確性を高めるためには、上記本発明遺伝子のうちの2以上、好ましくは複数個の遺伝子、より好ましくは本発明遺伝子の半数以上の遺伝子

について、その発現の有無または発現レベル（発現量）を評価することが望ましい。

【0076】(1-2) 抗体

また本発明は、軟骨障害の疾患マーカーとしてAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1」ともいう）、Rev-ErbA β 遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「Rev-ErbA β 」ともいう）、Selenoprotein P遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「Selenoprotein P」ともいう）、Aquaporin 1遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「Aquaporin 1」ともいう）、BMP-3b遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「BMP-3b」ともいう）、FK506-binding protein 1A遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「FK506-binding protein 1A」ともいう）、Apolipoprotein E遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「Apolipoprotein E」ともいう）、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「Acyl-CoA synthetase 5」ともいう）、Epoxide hydrolase 1遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「Epoxide hydrolase 1」ともいう）、またはGlutamine synthase遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「Glutamine synthase」ともいう）を特異的に認識することのできる抗体を提供する。

【0077】Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1としては配列番号1に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、Rev-ErbA β としては配列番号3に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、Selenoprotein Pとしては配列番号5に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、Aquaporin 1としては配列番号7に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、BMP-3bとしては配列番号9に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、FK506-binding protein 1Aとしては配列番号11に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、Apolipoprotein Eとしては配列番号13に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、Acyl-CoA synthetase 5としては配列番号15に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、Epoxide hydrolase 1としては配列番号17に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、Glutamine synthaseとしては配列番号19に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を挙げることができる。

【0078】なお、配列番号1に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的態様としては配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するタンバ

ク質を、配列番号3に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的態様としては配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号5に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的態様としては配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号7に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的態様としては配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号9に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的態様としては配列番号10で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号11に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的態様としては配列番号12で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号13に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的態様としては配列番号14で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号15に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的態様としては配列番号16で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号17に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的態様としては配列番号18で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、また配列番号19に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的態様としては配列番号20で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を例示することができる。

【0079】なお、ここで配列番号2に示すタンパク質は、ヒト由来のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(J. Clin. Invest. 86, 2086-2092, 1990)に記載されるように公知である。

【0080】また配列番号4に示すタンパク質は、ヒト由来のRev-ErbA β 遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Molecular Endocrinology 8: 996-1005, 1994)に記載されるように公知である。

【0081】また配列番号6に示すタンパク質は、ヒト由来のSelenoprotein P遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Proc Natl Acad Sci 90:537-41, 1993)に記載されるように公知である。また蛋白の発現や精製については既報(J Biol Chem 275:6288-94, 2000)を参考にして行うことができる。

【0082】また配列番号8に示すタンパク質は、ヒト由来のAquaporin 1遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 11110-11114, 1991)に記載されるように公知である。

【0083】また配列番号10に示すタンパク質は、ヒト由来のBMP-3b遺伝子によってコードされる公知のタンバ

ク質であり、その取得方法についても文献 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 304-310, 1996) に記載されるように公知である。

【0084】また配列番号12に示すタンパク質は、ヒト由来のFK506-binding protein 1A遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 5440-5443, 1990) に記載されるように公知である。

【0085】また配列番号14に示すタンパク質は、ヒト由来のApolipoprotein E遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献 (J Biol Chem 257: 14639-14641, 1982) に記載されるように公知である。

【0086】また配列番号16に示すタンパク質は、ヒト由来のAcyl-CoA synthetase 5遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献 (Oncogene, 19, 5919-5925, 2000) に記載されるように公知である。

【0087】また配列番号18に示すタンパク質は、ヒト由来のEpoxide hydrolase 1遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献 (Hum. Mol. Genet. 3, 421-428, 1994) に記載されるように公知である。

【0088】また配列番号20に示すタンパク質は、ヒト由来のGlutamine synthase遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献 (Nucleic Acids Res. 15, 6293, 1987) に記載されるように公知である。

【0089】本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、前記本発明タンパク質を免疫抗原とするポリクローナル抗体であっても、またそのモノクローナル抗体であってもよく、さらには当該本発明タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち少なくとも連続する、通常8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるポリペプチドに対して抗原結合性を有する抗体も、本発明の抗体に含まれる。

【0090】これらの抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12~11.13)。具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製したAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseを用いて、あるいは常法に従って当該いずれかの本発明タンパク質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得

ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製したAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthase、あるいはこれらタンパク質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。さらに、抗ヒトAquaporin 1抗体 (SantaCruz社) のように市販品を使用することもできる。

【0091】また、抗体の作製に使用されるタンパク質は、後記配列表に記載する遺伝子の配列情報 (配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, または19) に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、あるいは文献記載の方法 (Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)) などに準じて行うことができる。具体的にはAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseをコードする遺伝子が所望の宿主細胞中で発現できる組み換えDNA (発現ベクター) を作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養して、得られる培養物から、目的タンパク質を回収することによって実施することができる。また、これらAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseは、後記配列表に記載するアミノ酸配列の情報 (配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18または20) に従って、一般的な化学合成法 (ペプチド合成) によって製造することもできる。

【0092】なお、本発明のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseには、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18または20に示すタンパク質のみならず、その相同物も包含される。該相同物としては、上記配列番号で示されるアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ上記配列番号で示されるタンパク質の機能

と同等の生物学的機能を有するか、及び／または免疫学的活性において同等の活性を有するタンパク質を挙げることができる。

【0093】なお、ここで配列番号2,4,6,8,10,12,14,16,18または20で示されるタンパク質の機能と同等の生物学的機能を有するタンパク質としては、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseと生化学的または薬理的機能において同等の機能を有するタンパク質を挙げることができ、また上記タンパク質と免疫学的活性において同等の活性を有するタンパク質としては、適当な動物あるいはその細胞において特定の免疫反応を誘発し、かつAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseに対する抗体と特異的に結合する能力を有するタンパク質を挙げることができる。

【0094】なお、タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その生物学的機能及び／または免疫学的活性が保持される限り制限はない。生物学的機能や免疫学的活性を喪失することなくアミノ酸残基が、どのように、何個置換、挿入あるいは欠失されればよいかを決定する指標は、当業者に周知のコンピュータプログラム、例えばDNA Star softwareを用いて見出すことができる。例えば変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。また置換されるアミノ酸は、置換後に得られるタンパク質がAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの生物学的機能及び／または免疫学的活性を保持している限り、特に制限されないが、タンパク質の構造保持の観点から、残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性並びに両親媒性など、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe及びTrpは互いに非極性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn及びGlnは互いに非荷電性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Asp及びGluは互いに酸性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、またLys、Arg及びHisは互いに塩基性アミノ酸に分類されるアミノ酸である。ゆえに、これらを指標として同群に属するアミノ酸を適宜選択することができる。

【0095】また本発明の抗体は、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、

Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを用いて調製されるものであってよい。かかる抗体誘導のために用いられるオリゴペプチドは、機能的な生物活性を有することは要しないが、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseと同様な免疫原特性を有するものであることが望ましい。好ましくはかかる特性を有し、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseのアミノ酸配列において少なくとも連続する、通常8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるポリペプチドを例示することができる。

【0096】かかるポリペプチドに対する抗体の生成は、宿主に依じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うこともできる。限定はされないが、そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、並びにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン及びジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG（カルメットーゲラン桿菌）やコリネバクテリウム・パルグムなどのヒトアジュバントなどがある。

【0097】本発明の抗体はAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseに特異的に結合する性質を有することから、該抗体を利用することによって、被験者の組織内に発現した上記本発明タンパク質を特異的に検出することができる。すなわち、当該抗体は被験者の組織内におけるAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseのタンパク発現の有無を検出するためのプローブとして有用である。

【0098】具体的には、患者の関節／軟骨組織、例えば関節軟骨組織や関節滑膜組織の一部をバイオプシ等で採取するか、若しくはこれらの組織周辺の血液・滑液を採取し、そこから常法に従ってタンパク質画分を調製して、例えばウェスタンブロット法、ELISA法など公知の検出方法において、上記抗体を常法に従ってプローブとして使用することによってAcetyl-Coenzyme A acetyltr

ansferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1 またはGlutamine synthaseを検出することができる。

【0099】軟骨障害の診断に際しては、被験者の関節／軟骨組織におけるAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1およびGlutamine synthaseのいずれか少なくとも1つと正常な関節／軟骨組織におけるこれらのタンパク質との量の違いを判定すればよい。この場合、タンパク質量の違いには、タンパク質のある／なし、あるいはタンパク質の量が1.5倍以上、好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上ある場合が含まれる。具体的には、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子は軟骨障害の障害関節（軟骨）組織で発現誘導（増大）を示していたので、被験者の関節／軟骨組織に該遺伝子の発現産物（Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1および/またはGlutamine synthase）が存在しており、該量が正常な関節／軟骨組織の発現産物量と比べて1.5倍以上、好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上多いことが判定されれば、被験者について軟骨障害の罹患が疑われる。

【0100】とりわけ、配列番号：9の塩基配列を有するBMP-3b遺伝子、および配列番号：17の塩基配列を有するEpoxide hydrolase 1遺伝子は、軟骨障害患者の障害軟骨を含む膝関節組織で、正常な膝関節組織に比べて10倍以上の発現増大を示していた。このため、配列番号：9若しくは17に示される塩基配列を有する遺伝子によってコードされるタンパク質、具体的には、例えば配列番号：10のアミノ酸配列を有するBMP-3b、若しくは配列番号：18のアミノ酸配列を有するEpoxide hydrolase 1を特異的に認識する抗体を有する疾患マーカーが、軟骨障害の検出（診断）に有用と思われる。

【0101】（2）軟骨障害の検出方法（診断方法）
本発明は、前述する本発明の軟骨障害の疾患マーカーを利用した軟骨障害の診断方法を提供するものである。

【0102】具体的には、本発明の診断方法は、被験者の関節／軟骨組織、例えば関節軟骨組織や関節滑膜組織の一部をバイオプシ等で採取するか、若しくはこれらの組織周辺の血液・滑液を採取し、そこに含まれる軟骨障害に関連するAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、A

quaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の遺伝子発現レベル、あるいはこれらの遺伝子に由来するタンパク質（Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1、Glutamine synthase）を検出し、その発現量またはそのタンパク質量を測定することにより、軟骨障害の罹患の有無またはその程度を診断するものである。

【0103】本発明の診断方法は次の(a)、(b)及び(c)の工程を含むものである：

(a) 被験者の生体試料と本発明の疾患マーカーを接触させる工程、(b) 生体試料中のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の遺伝子発現レベル、またはAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseのタンパク質の量を、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、(c) (b)の結果をもとに、軟骨障害の罹患を判断する工程。

【0104】ここで用いられる生体試料は、被験者から採取される関節／軟骨組織（例えば関節軟骨組織や関節滑膜組織、あるいはこれら組織の周辺に存在する血液・滑液）、該組織から調製されるRNA若しくはそれからさらに調製されるポリヌクレオチド、または上記組織から調製されるタンパク質である。かかるRNA、ポリヌクレオチドまたはタンパク質は、被験者の関節軟骨組織や関節滑膜組織の一部をバイオプシ等で採取するか、若しくはこれらの組織周辺の血液・滑液を採取し、そこから常法に従って調製することができる。

【0105】本発明の診断方法は、測定対象として用いる生体試料の種類に応じて、具体的には下記のようにして実施される。

【0106】(2-1) 測定対象の生体試料としてRNAを利用する場合

診断に用いる生体試料としてRNAを利用する場合は、本発明の検出方法（診断方法）は該RNA中のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発

現レベルを検出し、測定することによって実施される。

【0107】この場合、本発明の検出方法は次の

(a)、(b)及び(c)の工程を含む：

(a)被験者の生体試料と本発明の疾患マーカーとを接触させる工程、(b)上記工程によって本発明の疾患マーカーに特異的に結合した生体試料由来のRNAまたはそれから転写された相補的なポリヌクレオチドを上記疾患マーカーを指標として測定する工程、及び(c)(b)の測定結果をもとに、軟骨障害の罹患を判断する工程。

【0108】本発明の軟骨障害の検出方法(診断方法)は、特に測定対象の生体試料としてRNAを利用して、該RNA中のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現レベルを検出し、測定することによって実施される。具体的には、前述のポリヌクレオチドからなる本発明の疾患マーカー(Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び/又はその相補的なポリヌクレオチド)をプライマーまたはプローブとして用いて、ノーザンブロット法、RT-PCR法、DNAチップ解析法、in situハイブリダイゼーション解析法などの公知の方法を行うことにより実施できる。

【0109】ノーザンブロット法を利用する場合は、本発明の上記疾患マーカーをプローブとして用いることによって、RNA中のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現の有無やその発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、本発明の疾患マーカー(相補鎖)を放射性同位元素(^{32}P 、 ^{33}P など:RI)や蛍光物質などで標識し、それを、常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーした被験者の生体組織由来のRNAとハイブリダイズさせた後(工程(a))、形成された疾患マーカー(DNAまたはRNA)とRNAとの二重鎖を、疾患マーカーの標識物(RI若しくは蛍光物質)に由来するシグナルを放射線検出器(BAS-1800II、富士フィルム社製)または蛍光検出器で検出、測定する(工程(b))方法を例示することができる。また、AlkPhos Direct Labelling and Detection System (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて、該

プロトコールに従って疾患マーカー(プローブDNA)を標識し、被験者の生体組織由来のRNAとハイブリダイズさせた後(工程(a))、疾患マーカーの標識物に由来するシグナルをマルチバイオイメージャーSTORM860 (Amersham Pharmacia Biotech社製)で検出、測定する(工程(b))方法を使用することもできる。

【0110】RT-PCR法を利用する場合は、本発明の上記疾患マーカーをプライマーとして用いことによって、RNA中のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現の有無や発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、被験者の生体組織由来のRNAから常法に従ってcDNAを調製して、これを鋳型として標的のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の領域が増幅できるように、本発明の疾患マーカーから調製した一対のプライマー(上記cDNA(一鎖)に結合する正鎖、+鎖に結合する逆鎖)をこれとハイブリダイズさせて(工程(a))、常法に従ってPCR法を行い、得られた増幅二本鎖DNAを検出する(工程(b))方法を例示することができる。なお、増幅された二本鎖DNAの検出は、上記PCRを予めRIや蛍光物質で標識しておいたプライマーを用いて行うことによって産生される標識二本鎖DNAを検出する方法、産生された二本鎖DNAを常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーさせて、標識した疾患マーカーをプローブとして使用してこれとハイブリダイズさせて検出する方法などを用いることができる。なお、生成された標識二本鎖DNA産物はアジレント2100バイオアナライザ(横河アナリティカルシステムズ社製)などで測定することができる。また、SYBR Green RT-PCR Reagents (Applied Biosystems 社製)で該プロトコールに従ってRT-PCR反応液を調製し、ABI PRIME 7700 Sequence Detection System(Applied Biosystems 社製)で反応させて、該反応物を検出することもできる。

【0111】また、DNAチップ解析を利用する場合は、本発明の上記疾患マーカーをDNAプローブ(1本鎖または2本鎖)として貼り付けたDNAチップを用意し、これに被験者の生体組織由来のRNAから常法によって調製されたcRNAとハイブリダイズさせて(工程(a))、形成されたDNAとcRNAとの二本鎖を、本発明の疾患マーカーから調製される標識プローブと結合させて検出する(工程(b))方法を挙げることができる。また、上記DNAチップとして、Acetyl-Coenzyme A acetyltrans

ferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P 遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutaminesynthase遺伝子の遺伝子発現レベルの検出、測定が可能なDNAチップを用いることもできる。かかる遺伝子の発現レベルを検出、測定することができるDNAチップとしては、Affymetrix社のGene Chip Human Genome U95 A, B, C, D, Eを挙げることができる。かかるDNAチップを用いた、被験者RNA中のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の遺伝子発現レベルの検出、測定については、実施例において詳細に説明する。

【0112】(2-2) 測定対象物としてタンパク質を用いる場合

測定対象物としてタンパク質を用いる場合は、本発明の検出方法(診断方法)は生体試料中のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseを検出し、その量を測定することによって実施される。具体的には、抗体に関する本発明の疾患マーカー(配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18または20で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質を認識する抗体)を用いてウエスタンブロット法などの公知方法で、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseを検出、定量する方法を挙げることができる。ウエスタンブロット法は、一次抗体として本発明の上記疾患マーカーを用いて測定対象タンパク質と結合させた後(工程(a))、二次抗体として¹²⁵Iなどの放射性同位元素や蛍光物質で標識した一次抗体に結合する抗体を用いて、測定対象タンパク質を間接的に標識し、該放射性同位元素若しくは蛍光物質由来のシグナルを放射線測定器(BAS-1800II:富士フイルム社製など)若しくは蛍光検出器で検出し、測定する(工程(b))ことによって実施できる。また、一次抗体として本発明の上記疾患マーカーを用いた後、ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech 社製)を用いて、該プロトコールに従って検出し、マルチバイオイメージャーSTORM860(Amersham Pharmacia Biotech 社製)で測定することもできる。

【0113】測定対象物としてRNAを用いる場合、及びタンパク質を用いる場合のいずれも、工程(c)は下記の

ようにして行うことができる。

【0114】まず、被験者の関節/軟骨組織、例えば関節軟骨組織や関節滑膜組織、あるいはこれらの組織周辺に存在する血液・滑液におけるAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の遺伝子発現レベル、もしくはこれらの遺伝子の発現産物であるタンパク質(Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthase)の量を正常な前記組織の当該遺伝子発現レベルまたは当該タンパク質の量と比較し、両者の違いを判定する。

【0115】この場合、正常な関節/軟骨組織から採取調製した生体試料(RNAまたはタンパク質)が必要であるが、これらは軟骨障害に罹患していない人の関節/軟骨組織、例えば関節軟骨組織や関節滑膜組織の一部をバイオプシ等で採取するか、若しくはこれら組織周辺の血液・滑液を採取することによって取得することができる。なお、ここでいう「軟骨障害に罹患していない人」とは、少なくとも軟骨障害の自覚症状がなく、好ましくは他の検査方法、例えばX線フィルム撮影による診断の結果、軟骨障害でないと診断された人をいう。なお、当該「軟骨障害に罹患していない人」を以下、本明細書では単に正常者という場合もある。

【0116】被験者の関節/軟骨組織と正常な関節/軟骨組織(軟骨障害に罹患していない人の関節/軟骨組織)との遺伝子発現レベルまたはタンパク質の量の比較は、被験者の生体試料と正常者の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数(少なくとも2つ、好ましくは3以上、より好ましくは5以上)の正常な関節/軟骨組織を用いて均一な測定条件で測定して得られたAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の遺伝子発現レベル、若しくはこれらの遺伝子の発現産物であるタンパク質(Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthase)の量の平均値または統計的中間値を、正常者の遺伝子発現レベル若しくはタンパク質の量として、比較に用いることができる。

【0117】次いで、上記判定の結果に基づいて軟骨障害の罹患の有無を判断する。被験者が、軟骨障害であるかどうかの判断は、具体的には該被験者の関節／軟骨組織における前記本発明遺伝子の遺伝子発現レベル、またはその発現産物である本発明タンパク質の量が、正常者のそれらと比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上多いことを指標として行うことができる。また、被験者の上記遺伝子発現レベルまたはタンパク質の量が、いかなる正常者のそれらのレベルまたは量に比べて多ければ、軟骨障害であると判断することができる。ゆえに、工程(c)は、より詳細には、

「工程(b)で得られた被験者の生体試料中の各遺伝子の発現レベルまたは各タンパク質の量を、これに対応する正常者の各遺伝子の発現レベルまたは各タンパク質の量と比較し、その増減を指標として被験者について軟骨障害の罹患の有無を判断する工程」ということができる。

【0118】なお、上記方法のうち、(2-1)測定対象の生体試料としてRNAを利用して軟骨障害を検出(診断)する場合、すなわち遺伝子の発現の有無または遺伝子発現レベル(発現量)から軟骨障害を検出(診断)する場合は、検出(診断)の精度や正確性を高めるために、本発明遺伝子のうち2以上、好ましくは複数個の遺伝子、より好ましくは本発明遺伝子の半数以上の遺伝子について、発現の有無または発現のレベル(発現量)を評価し、その結果から軟骨障害を検出(診断)することが望ましい。複数個の遺伝子について評価する場合には、個々の遺伝子での評価をスコア化し、総合的に軟骨障害を診断することが可能である。なお、この場合、評価する遺伝子数、スコアあるいは診断基準は限定されない。

【0119】(3) 候補薬のスクリーニング方法

(3-1) 遺伝子発現レベルを指標とするスクリーニング方法

本発明は、配列番号1に記載の塩基配列を有するAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、配列番号3に記載の塩基配列を有するRev-ErbA β 遺伝子、配列番号5に記載の塩基配列を有するSelenoprotein P遺伝子、配列番号7に記載の塩基配列を有するAquaporin 1遺伝子、配列番号9に記載の塩基配列を有するBMP-3b遺伝子、配列番号11に記載の塩基配列を有するFK506-binding protein 1A遺伝子、配列番号13に記載の塩基配列を有するApolipoprotein E遺伝子、配列番号15に記載の塩基配列を有するAcyl-CoA synthetase 5遺伝子、配列番号17に記載の塩基配列を有するEpoxide hydrolase 1遺伝子、または配列番号19に記載の塩基配列を有するGlutamine synthase遺伝子の発現を制御する物質をスクリーニングする方法を提供する。

【0120】本発明のスクリーニング方法は次の工程

(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質とAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、

Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞の上記遺伝子の発現量と比較する工程、(c) 上記の比較結果に基づいて、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の遺伝子発現量を変動させる被験物質を選択する工程。

【0121】かかるスクリーニングに用いられる細胞としては、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子を発現する細胞であって、かつ軟骨細胞への分化が可能である、未分化間葉系細胞または初代培養軟骨細胞を挙げることができる。軟骨細胞への分化が可能な未分化間葉系細胞としては、具体的には、マウスATDC5細胞(RIKEN Cell Bank; HYPERLINK <http://www.rtc.riken.go.jp/CELL/HTML/RIKENCellBank.html> から入手可能)などを挙げることができる。なお、マウスATDC5細胞は、分化誘導物質であるインスリンの添加で軟骨細胞に分化することが知られている細胞である(J Cell Biol 133:457-468, 1996)。

【0122】また、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子を発現する細胞であって、かつ力学的ストレスに応答可能である、初代培養軟骨細胞、軟骨細胞様細胞株または滑膜細胞様細胞株も挙げることができる。力学的ストレスに応答することが知られている細胞としては、具体的には初代培養軟骨細胞、ウサギ滑膜様細胞株HIG-82(ATCCカタログ番号CRL-1832HYPERLINK <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/CellBiology.cfm> <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/CellBiology.cfm>より入手可能)、ヒト滑膜様細胞株MH7A(RIKEN Cell Bank; HYPERLINK <http://www.rtc.riken.go.jp/CELL/HTML/RIKENCellBank.html> から入手可能)などを挙げることができる。

www.rtc.riken.go.jp/CELL/HTML/RIKEN_Cell_Bank.html” http://www.rtc.riken.go.jp/CELL/HTML/RIKEN_Cell_Bank.html から入手可能)、ヒト軟骨様細胞株HCS 2/8などを挙げるができる。これらの細胞株は力学的負荷に応答して通常とは異なる細胞性質(サイトカイン・MMP産生能の亢進等)を示すことが報告されている(Journal of Bone & Mineral Research. 13(3):443-53, 1998, Bone 28:399-403, 2001, Hip Joint 23:235-239, 1997)。

【0123】さらに、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子を発現する細胞であって、かつLPSや炎症性サイトカインによる処理を施した、初代培養軟骨細胞、軟骨細胞様細胞株又は滑膜細胞様細胞株も挙げるができる。これらの細胞株はLPSや炎症性サイトカイン(例えばIL-1、IL-6、TNF)で処理することにより障害を受け、より軟骨障害に近い状態になることが知られている(Ann.Rheum.Dis., 50, 75-80, 1991)。

【0124】以上に挙げたような細胞の他、細胞の集合体である組織(例えば軟骨障害モデル動物由来の関節/軟骨組織など)も、本発明のスクリーニングに用いられる「細胞」の範疇に含まれる。

【0125】候補物質となりえるものとしては、制限されないが、核酸(本発明遺伝子のアンチセンス核酸を含む)、ペプチド、タンパク質(本発明タンパク質に対する抗体を含む)、有機化合物、無機化合物などであり、スクリーニングは、具体的にはこれらの候補物質となり得る被験物質を含む試料(被験試料)を上記組織/または細胞と接触させて行うことができる。かかる被験試料としては細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これに制限されない。

【0126】また、スクリーニングに際して、被験物質と細胞とを接触させる条件は、特に制限されないが、該細胞が死なないように、その培養条件(温度、pH、培地組成など)を大きく変化させない条件を採用することが好ましい。

【0127】実施例に示すように、軟骨障害に罹患した患者・動物の障害関節(軟骨)組織には、特異的にAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子、Glutamine synthase 遺伝子が発現上昇しており、また疾患の進行に伴って発現が増大している。この知見から、これら本発明遺伝子

の発現は軟骨障害と関連していると考えられる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子、Glutamine synthase遺伝子の発現またはその発現誘導が軟骨障害と関連していることを利用したものである。よって、該軟骨障害の緩和/抑制作用を有する(軟骨障害に対して改善/治療効果を発揮する)物質の探索には、上記Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現有無や発現レベルの変動が指標とされる。

【0128】すなわち、本発明のスクリーニング方法は、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現を制御する物質を探索することによって、軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質を提供するものである。

【0129】なお、ここで「遺伝子の発現を制御する」とは、「遺伝子の発現を抑制するように制御する」という意味と、「遺伝子の発現を上昇(誘導)するように制御する」という意味の2つの意味を含む。

【0130】上記いずれかの遺伝子の発現を抑制(発現レベルの減少、発現誘導の抑制)するように制御する物質の探索は、具体的にはAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P 遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子が発現している細胞を用いる場合は、被験物質を添加した細胞におけるAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現レベルが、被験物質を添加しない細胞のそのレベルに比して低くなること、またこれら本発明遺伝子の発現に発現誘導物質を必要とする細胞を用いる場合は、発現誘導物質(例えば、マウスATDC5細胞の場合はインスリン)によって誘導される発現が候補物質の存在によって抑制されること、すなわち発現誘導物質存在

下で候補物質を接触させた細胞の遺伝子発現が、発現誘導物質存在下で候補物質を接触させない対照細胞（正のコントロール）に比して低くなることをもって、行うことができる。

【0131】中でも好適には、Aquaporin 1遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子、またはGlutamine synthase遺伝子の発現を抑制（発現レベルの減少、発現誘導の抑制）するように制御する物質の探索を挙げることができる。

【0132】すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)および(c)を含むAquaporin 1遺伝子の発現を抑制するように制御する物質のスクリーニング方法を包含するものである：

(a) 被験物質とAquaporin 1遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のAquaporin 1遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のAquaporin 1遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、Aquaporin 1遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【0133】また本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)および(c)を含むFK506-binding protein 1A遺伝子の発現を抑制するように制御する物質のスクリーニング方法を包含するものである：

(a) 被験物質とFK506-binding protein 1A遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のFK506-binding protein 1A遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のFK506-binding protein 1A遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、FK506-binding protein 1A遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【0134】また本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)および(c)を含むEpoxide hydrolase 1遺伝子の発現を抑制するように制御する物質のスクリーニング方法を包含するものである：

(a) 被験物質とEpoxide hydrolase 1遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のEpoxide hydrolase 1遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のEpoxide hydrolase 1遺伝子の発現量と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、Epoxide hydrolase 1遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【0135】また本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)および(c)を含むGlutamine synthase遺伝子の発現を抑制するように制御する物質のスクリーニング方法を包含するものである：

(a) 被験物質とGlutamine synthase遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のGlutamine synthase遺伝子の発現量を測定し、

該発現量を被験物質を接触させない対照細胞のGlutamine synthase遺伝子の発現量と比較する工程、(c)

(b)の比較結果に基づいて、Glutamine synthase遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【0136】一方、上記いずれかの遺伝子の発現を上昇（発現レベルの増加、発現誘導の亢進）するように制御する物質の探索は、具体的にはAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子が発現している細胞を用いる場合は、被験物質を添加した細胞におけるAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現レベルが、被験物質を添加しない細胞のそのレベルに比して高くなること、またこれら本発明遺伝子の発現に発現誘導物質を必要とする細胞を用いる場合は、発現誘導物質（例えば、マウスATDC5細胞の場合はインスリン）によって誘導される発現が候補物質の存在によって亢進されること、すなわち発現誘導物質存在下で候補物質を接触させた細胞の遺伝子発現が、発現誘導物質存在下で候補物質を接触させない対照細胞（正のコントロール）に比して高くなることをもって、行うことができる。

【0137】軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質は、上記スクリーニング方法によって、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の少なくとも1つの遺伝子の発現変動を指標として選別される、上記遺伝子の発現制御物質に包含される。なお、ここでいう「発現制御物質」の中には、Aquaporin 1遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現抑制を指標として選別される、上記遺伝子の発現抑制制御物質が含まれる（以下、同じ）。

【0138】したがって、上記スクリーニング方法は、上記各遺伝子の発現制御物質の探索方法であると同時に、軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質の探索方法として位置付けることができる。

【0139】Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA syn

thetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の少なくとも1つの遺伝子の発現を制御する物質（発現制御物質）の選別（探索）または軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質の選別（探索）には、下記の方法を用いることもできる。

【0140】例えばATDC5細胞を用いる方法として、インスリンを添加したATDC5細胞（対照細胞）と、インスリンと被験物質とを同時に加えたATDC5細胞とで上記各本発明遺伝子の発現レベルを比較し、その発現レベルの変動（減少／上昇）を指標として発現制御物質または候補物質を選別する方法を挙げることができる。また、インスリンを添加して、既に本発明遺伝子が発現誘導／または発現抑制された状態のATDC5細胞に被験物質を添加し、被験物質を添加しない対照のATDC5細胞と本発明遺伝子の発現レベルを比較して、その発現レベルの低下／または上昇を指標として発現制御物質または候補物質を選別することもできる。この場合、軟骨細胞の分化亢進に起因する軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質を選別することが可能となる。

【0141】また、例えばラット初代培養関節軟骨細胞を用いて発現制御物質または候補物質をスクリーニングする方法の一つとしては、細胞伸展装置（フレクサーセルテンションシステム：米国FLEXCELL社、培養細胞伸展システム：大阪スカラテック社など）により力学的負荷をかけた初代培養関節軟骨細胞（対照細胞）と、力学的負荷と被験物質とを同時に加えた初代培養関節軟骨細胞とで上記本発明遺伝子の発現レベルを比較し、その発現レベルの減少／上昇を指標として発現制御物質または候補物質を選別する方法を挙げることができる。なお、上記遺伝子のうちAquaporin 1遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子を対象とする場合は、発現レベルの減少（低下）を指標として発現制御物質（発現抑制制御物質）または候補物質を選別することができる（以下において同じ）。また、力学的負荷を加えて既に本発明遺伝子が発現誘導／または発現抑制された状態の初代培養関節軟骨細胞に被験物質を添加し、被験物質を添加しない対照の初代培養関節軟骨細胞と本発明遺伝子の発現レベルを比較して、その発現レベルの低下／または上昇を指標として発現制御物質または候補物質を選別することもできる。この場合、力学的負荷異常に起因する軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質を選別することが可能となる。

【0142】またラット初代培養関節軟骨細胞を用いて発現制御物質または候補物質をスクリーニングするもう一つの方法としては、IL-1若しくはTNF α を添加した初代培養関節軟骨細胞（対照細胞）と、IL-1若しくはTNF α と被験物質とを同時に加えた初代培養関節軟骨細胞とで上記各本発明遺伝子の発現レベルを比較し、その発現

レベルの減少／上昇を指標として発現制御物質または候補物質を選別する方法を挙げることができる。また、IL-1若しくはTNF α を添加して、既に本発明遺伝子が発現誘導または発現抑制された状態の初代培養関節軟骨細胞に被験物質を添加し、被験物質を添加しない対照の初代培養関節軟骨細胞と本発明遺伝子の発現レベルを比較して、その発現レベルの低下／または上昇を指標として発現制御物質または候補物質を選別することもできる。この場合、炎症反応に起因する軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質を選別することが可能となる。

【0143】このような遺伝子の発現レベルの検出及び定量は、前記細胞から調製したRNA又はそれから転写された相補的なポリヌクレオチドを用いて、ノーザンブロット法、RT-PCR法など公知の方法の他、DNAチップなどを利用して実施できる。これら公知の方法については、前記本発明の診断方法に関する(2-1)の項を参照されたい。指標とする遺伝子発現の変動（低下（減少）／上昇）の程度は、被験物質（発現制御物質、候補物質）を添加した細胞におけるAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現が被験物質（発現制御物質、候補物質）を添加しない対照細胞での発現量と比較して10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上の変動（低下（減少）／上昇）を例示することができる。

【0144】またAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現レベルの検出及び定量は、これらの遺伝子の発現を制御する遺伝子領域（発現制御領域）に、例えばルシフェラーゼ遺伝子などのマーカー遺伝子をつないだ融合遺伝子を導入した細胞株を用いて、マーカー遺伝子由来のタンパク質の活性を測定することで実施することもできる。本発明のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現制御物質のスクリーニング方法には、かかるマーカー遺伝子の発現量を指標として標的物質を探索する方法も包含されるものであり、この意味において請求項7乃至12に記載する「Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein

P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子」の概念には、これら本発明遺伝子の発現制御領域とマーカー遺伝子との融合遺伝子が含まれる。

【0145】なお、上記マーカー遺伝子としては、発光反応や呈色反応を触媒する酵素の構造遺伝子が好ましく、具体的には上記のルシフェラーゼ遺伝子のほか、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β グルクロニダーゼ遺伝子、 β ガラクトシダーゼ遺伝子、及びエクオリン遺伝子などのレポーター遺伝子もまた使用することができる。ここでAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現制御領域としては、例えば該遺伝子の転写開始部位上流約1kb、好ましくは約2kbを用いることができる。なおヒトSelenoprotein P遺伝子のプロモーター領域については文献(Gene 175, 269-70, 1996, J. Biol. Chem., 272, 29364-71, 1997)において決定されており、またヒトAcetyl-CoA acetyltransferase 1のプロモーター領域については文献(Gene 109, 285-90, 1991)において決定されているため、これらの文献に開示されたプロモーター領域を使用することができる。

【0146】融合遺伝子の作成、およびマーカー遺伝子由来の活性測定は公知の方法で行うことができる。

【0147】本発明のスクリーニング方法は、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子のいずれか少なくとも1種の発現を制御(抑制・減少/または上昇)させる物質を探索することによって、軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補化合物を提供するものである。

【0148】上記スクリーニング方法によって選別される発現制御物質の中から、さらに軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質を選別する方法としては、従来公知である如何なる選別方法をも用いることができるが、代表的な方法として、例えばヒト軟骨様細胞株SW1353(ATCC)あるいはヒト滑膜細胞株SW982(ATCC)を用いて、軟骨破壊因子であるMMP(例えばMMP13)の産生量の変動を指標にして評価する方法を挙げることができる。

【0149】具体的には下記の方法を例示することができる：すなわち、10%の牛胎児血清(GIBCO BRL)を添加

したDMEM(GIBCO BRL)で前記細胞を継代し、実験時、96ウェルプレートに 2×10^5 cells/mlの細胞濃度で0.1 ml/wellずつまきこむ。終濃度10 ng/mlのHuman IL-1 β を添加することで刺激を加え、同時に、被験物質(前記発現制御物質)を終濃度5 μ g/mlの濃度で添加する。培養は24時間行い、上清を回収して-80℃に保存する。上清中のMMP13量は、MMP13アッセイシステム(アマシャムファルマシアバイオテック社)を用い、添付のプロトコールに従って培地を2倍希釈したものの濃度を測定する。被験物質に30%以上のMMP13産生抑制能が認められる場合は、軟骨障害治療薬としての効果がある可能性が高いと判断する。

【0150】また同様の実験を、IL-1 β の代わりに他の炎症性サイトカイン(TNF α 、IL-18等)を用いることによっても行うことができる。さらにMMPの代わりにPGE2産生量の変動を指標にすることによっても行うことができる。

【0151】また、本発明のスクリーニング方法を実施する前に、上記に掲げる本発明の各遺伝子について、あらかじめ下記に説明する実験をすることにより、該遺伝子の発現を抑制する物質が軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分(候補物質)として有用なのか、また発現を上昇(誘導)する物質が軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分(候補物質)として有用なのかを判断することができる。各々の遺伝子について、その発現を抑制する物質が候補物質として有用と判断された場合は、該遺伝子についての上記スクリーニング方法は、その発現の抑制を指標として実施することができ、逆にその発現を上昇(誘導)する物質が候補物質として有用と判断された場合は、該遺伝子についての上記スクリーニング方法は、その発現の上昇(誘導)を指標として実施することができる。

【0152】かかる実験としては、例えば、ヒト滑膜細胞株SW982(ATCC)を用いて炎症性メディエーターであるPGE2の産生量の変動を指標にする方法を挙げることができる。

【0153】具体的には、下記の実験においてPGE2の産生量が阻害される場合は、その遺伝子発現抑制物質を選別することによって、より高い精度で軟骨障害の改善薬または治療薬の候補物質を取得することが可能となる：細胞は通常10%の牛胎児血清(GIBCO BRL)を添加したDMEM(GIBCO BRL)培地で培養する。実験時、 1×10^5 cells/mlになるように培地で希釈し、12穴プレートに1 ml/wellの細胞を播きこむ。24時間培養の後、本発明遺伝子のアンチセンスオリゴDNAを遺伝子導入する。その後、培地交換とともに終濃度10 ng/mlのHuman IL-1 β を添加することで刺激を加える。Human IL-1 β 添加後24時間培養を行ったのち培養上清を回収し、Prostaglandin E2 EIAシステム(アマシャムファルマシアバイオテック社)を用いて培養上清中のPGE2量を測定する。本発明遺

伝子のアンチセンスオリゴDNAの導入により当該PGE2の産生量が30%以上阻害される場合は、その遺伝子発現抑制物質が治療薬になる可能性が高いと考えられる。また下記の実験においてPGE2の産生量が阻害される場合は、その遺伝子発現誘導（亢進）物質を選別することによって、より高い精度で軟骨障害の改善薬または治療薬の候補物質を取得することが可能となる：哺乳動物細胞発現ベクター（ストラタジーン社pSG5等）を用い、本発明遺伝子の発現ベクターを作製し、これを対象とする上記の細胞に導入する。なお、導入は上記の方法と同様に行うことができる。本発明遺伝子の導入により前記PGE2の産生量が30%以上阻害される場合は、その遺伝子発現誘導（亢進）物質が治療薬になる可能性が高いと考えられる。

【0154】以上のスクリーニング方法により被験物質から選別される物質は、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子のいずれか少なくとも1種の発現制御剤として位置づけることができる。これらの物質が有する本発明遺伝子に対する発現制御作用は軟骨障害の抑制に深く関っているものと考えられる。よって、これらの物質は、軟骨障害を緩和、抑制（改善、治療）する薬物の有力な候補物質となる。

【0155】(3-2) タンパク質の機能を指標とするスクリーニング方法

本発明は、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能（活性）を制御する物質をスクリーニングする方法を提供する。

【0156】本発明のスクリーニング方法は次の工程

(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthase由来の機能（活性）を測定し、該機能（活性）を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分の上記Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA

β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能（活性）と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能（活性）を変動させる被験物質を選択する工程。

【0157】なお、上記のスクリーニング方法は、上記の本発明タンパク質の機能（活性）を指標とするものであるが、該機能（活性）はそのタンパク質の発現量（生成量）に応じて変動しえるものである。従って上記スクリーニング方法は、上記に掲げる少なくとも1つの本発明タンパク質の量（生成量）を指標して行うこともでき、以下、本明細書中では特に言及しないが、当該方法も当然に本発明の範疇に含まれるものである。

【0158】かかるスクリーニングは、上記の本発明のタンパク質の少なくとも1つを含むものを対象として行うことができ、具体的には、本発明タンパク質の機能（活性）に応じて、水溶液、細胞またはその細胞画分のいずれかの形態のものを例示することができる。ここで水溶液とは、本発明タンパク質を含むものであればよく、特に制限されないが、例えば通常の水溶液の他、細胞溶解液、核抽出液あるいは培養上清なども含まれる。また細胞としては、内在性及び外来性などの由来に関わらず、本発明遺伝子を発現しており、本発明タンパク質を有する細胞を挙げることができる。また細胞画分とは、かかる細胞に由来する各種の画分を意味するものであり、例えば細胞膜画分、細胞質画分、および細胞核画分などを挙げることができる。

【0159】実施例に示すように、本発明タンパク質であるAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1およびGlutamine synthaseは、軟骨障害に罹患した患者の障害軟骨を含む膝関節組織で正常関節組織と比較して発現上昇しており、またラット十字靭帯切断モデルの障害軟骨においても、正常軟骨と比較して発現上昇していた。さらに前記本発明タンパク質の遺伝子発現は、病態の進行に伴って増大する傾向が示された。これらの知見から、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子がコードするタンパク質は、軟骨障害の発生、進行または抑制において関連性があるものと考えられる。すなわち本

発明のスクリーニング方法は、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子によりコードされるタンパク質が、軟骨障害と関連していることを利用したものである。よって、該軟骨障害の緩和／抑制作用を有する（軟骨障害に対して改善／治療効果を発揮する）物質の探索には、上記本発明タンパク質の機能または活性の変動（低下または抑制／上昇または亢進）が指標とされる。

【0160】すなわち軟骨障害の緩和／抑制作用を有する（軟骨障害に対して改善／治療効果を発揮する）物質の探索には、まず上記に掲げる少なくとも1つの本発明タンパク質の機能または活性の変動（低下または抑制／上昇または亢進）を指標として、当該タンパク質の機能または活性を制御する物質（制御物質）を探索することが必要である。なお、ここでいう「タンパク質の機能または活性を制御する物質（制御物質）」の中には、「タンパク質の機能または活性を抑制するように制御する物質」と「タンパク質の機能または活性を亢進するように制御する物質」の2つが含まれる。本発明は、上記に掲げる少なくとも1つの本発明タンパク質の機能または活性を制御する物質（制御物質）をスクリーニングする方法を提供し、それによって得られた制御物質を軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質として提供するものである。

【0161】本発明タンパク質機能（活性）を抑制（低下）させる方向に制御する物質の探索は、例えばAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分に被験物質を接触させた場合に得られる上記の少なくとも1つのタンパク質の機能（活性）が、被験物質を添加しない対照の水溶液、細胞または細胞画分の上記対応するタンパク質の機能（活性）に比して低くなることを指標として行うことができる。

【0162】中でも好適にはAquaporin 1、FK506-binding protein 1A、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの機能（活性）を抑制（低下）させる方向に制御する物質の探索を挙げることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)および(c)を含むAquaporin 1の機能または活性を抑制するように制御する物質のスクリーニング方法を包含するものである：

(a) Aquaporin 1を含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のAquaporin 1由来の機能（活性）を測定し、該機能（活性）を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のAquaporin 1の機能（活性）と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のAquaporin 1の機能（活性）を抑制する被験物質を選択する工程。

【0163】また本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)および(c)を含むFK506-binding protein 1Aの機能または活性を抑制するように制御する物質のスクリーニング方法を包含するものである：

(a) FK506-binding protein 1Aを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のFK506-binding protein 1A由来の機能（活性）を測定し、該機能（活性）を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のFK506-binding protein 1Aの機能（活性）と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のFK506-binding protein 1Aの機能（活性）を抑制する被験物質を選択する工程。

【0164】また本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)および(c)を含むEpoxide hydrolase 1の機能または活性を抑制するように制御する物質のスクリーニング方法を包含するものである：

(a) Epoxide hydrolase 1を含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のEpoxide hydrolase 1由来の機能（活性）を測定し、該機能（活性）を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のEpoxide hydrolase 1の機能（活性）と比較する工程、(c)

(b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のEpoxide hydrolase 1の機能（活性）を抑制する被験物質を選択する工程。

【0165】また本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)および(c)を含むGlutamine synthaseの機能または活性を抑制するように制御する物質のスクリーニング方法を包含するものである：

(a) Glutamine synthaseを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞またはその細胞画分のGlutamine synthase由来の機能（活性）を測定し、該機能（活性）を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞またはその細胞画分のGlutamine synthaseの機能（活性）と比較する工程、(c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液、細胞またはその細胞画分のGlutamine synthaseの機能（活性）を抑制する被験物質を選択する工程。

【0166】一方、本発明タンパク質の機能（活性）を

亢進（上昇、増加）させる方向に制御する物質の探索は、例えばAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分に被験物質を接触させた場合に得られる上記の少なくとも1つのタンパク質の機能（活性）が、被験物質を添加しない対照の水溶液、細胞または細胞画分の上記対応するタンパク質の機能（活性）に比して高くなることを指標として行うことができる。

【0167】軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質は、上記スクリーニング方法によって、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの少なくとも1つのタンパク質の機能（活性）の変動を指標として選別される上記タンパク質の機能（活性）制御物質に包含される。なお、ここでいう「タンパク質の機能（活性）制御物質」の中には、Aquaporin 1、FK506-binding protein 1A、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseのタンパク質の機能（活性）の抑制を指標として選別される、上記タンパク質の機能（活性）抑制制御物質が含まれる（以下、同じ）。

【0168】したがって、上記スクリーニング方法は、上記各本発明タンパク質の制御物質の探索方法であると同時に、軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質の探索方法として位置付けることができる。

【0169】ここで軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質となりえるものとしては、制限されないが、核酸、ペプチド、タンパク質（本発明タンパク質に対する抗体を含む）、有機化合物、無機化合物などであり、スクリーニングは、具体的にはこれらの候補物質となり得る被験物質を含む試料（被験試料）を上記水溶液、細胞またはその細胞画分と接触させて行うことができる。かかる被験試料としては細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これに制限されない。

【0170】Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1、Rev-ErbA β 、Selenoprotein P、Aquaporin 1、BMP-3b、FK506-binding protein 1A、Apolipoprotein E、Acyl-CoA synthetase 5、Epoxide hydrolase 1またはGlutamine synthaseの少なくとも1つの本発明タンパク質の機能（活性）を制御する物質（以下、単に「制御物質」ともいう）の選別（探索）方法、言い換えれば軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質（以下、単に「候補物質」ともいう）の選別（探索）方法としては、下記の方法を例示することができる。

【0171】以下、各本発明タンパク質の機能または活性に基づくスクリーニング方法につき、具体的に例示する。

(1) Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1の機能（活性）に基づくスクリーニング方法

本発明タンパク質の一つであるAcetyl-Coenzyme A (Acetyl-CoA) acetyltransferase 1は2つのAcetyl-CoA分子を濃縮する反応を触媒する酵素である。従って、該タンパク質の公知の性質を利用することにより、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1の機能（活性）を制御する制御物質または候補物質をスクリーニングすることができる。

【0172】Acetyl-CoA acetyltransferase 1の活性測定は、例えば文献 (Methods Enzymol 35:167-73, 1975) 記載の方法により行うことができる。具体的には、まず100 μ M Tris-HCl (pH8.2)、0.1 μ M EDTA、0.12 μ M acetoacetyl-CoA、0.09 μ M CoA、5-50 mU Acetyl-CoA acetyltransferase 1の水溶液を1.0 mlの容量で用意し、CoA以外の水溶液を混合して30℃で3分間ブレインキュベートした後、CoAを添加してacetoacetyl-CoAの消失を300 nmの吸光でモニターする (1cm/300nm=3.6 $\times 10^3$ M $^{-1}$) 方法を例示することができる。制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には前記反応系に被験物質を加えた水溶液、すなわちAcetyl-CoA acetyltransferase 1、acetoacetyl-CoA、CoA及び被験物質を基本成分として含む水溶液におけるAcetyl-CoA acetyltransferase活性が、被験物質を添加しない対照水溶液の当該活性レベルに比して、変動するか否かを指標として実施することができる。

【0173】(2) Rev-ErbA β の機能（活性）に基づくスクリーニング方法

本発明タンパク質の一つであるRev-ErbA β は転写抑制因子であり、転写活性化因子ROR α 1の標的遺伝子 (ROR α 1応答性遺伝子) 転写活性化を抑制することが知られている (Molecular Endocrinology., 8, 1234, 1994)。従って、該タンパク質の公知の性質を利用したRev-ErbA β の機能（活性）を制御（抑制／亢進）する制御物質または候補物質のスクリーニングは、ROR α 1応答性遺伝子の発現量の変動（増加／減少）を指標にして行うことができる。この場合は、スクリーニングに用いる対象細胞として、Rev-ErbA β を有し、且つROR α 1遺伝子及びROR応答性遺伝子を発現可能な細胞を用いることができる。また該細胞から調製される細胞画分も同様にして用いることができる。

【0174】具体的には、例えばCOS-7細胞にROR α 1遺伝子発現ベクター、Rev-ErbA β 遺伝子発現ベクター、ROR応答性遺伝子（例えば、ROR α 1がROR応答性遺伝子の発現制御に機能するために必要な遺伝子配列ROR応答性領域5'-ATACTAGGTCA-3'を含む発現制御領域とルシフェラーゼなどのマーカー遺伝子とをつないだ融合遺伝子）

発現ベクター、を導入した細胞株を用いて、ROR応答性遺伝子の発現量をマーカー遺伝子由来のタンパク質の活性を測定することによって間接的に検出し、定量する方法を挙げることができる。

【0175】なお、上記マーカー遺伝子としては、発光反応や接触反応を触媒する酵素の構造遺伝子が好ましく、具体的には上記ルシフェラーゼ遺伝子のほか、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β グルクロニダーゼ遺伝子、 β ガラクトシダーゼ遺伝子、及びエクオリン遺伝子などのレポーター遺伝子もまた使用することができる。同様なスクリーニング方法は公知であり(Biochem. Cell. Biol. 74, 585-593 (1996), Biologicals 26, 1-5 (1998))、これに準じて行うことができる。

【0176】制御物質または候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した細胞におけるROR応答性遺伝子の発現量が、被験物質を添加しない対照細胞の当該発現量に比して、変動するか否かを指標として行うことができる。具体的には、当該スクリーニングは、被験物質を添加した細胞におけるマーカー遺伝子由来のタンパク質の活性が、被験物質を添加しない対照細胞の当該活性レベルに比して、変動するか否かを指標として行うことができる。

【0177】また、Rev-ErbA β の機能(活性)を制御する制御物質または候補物質の別のスクリーニング方法として、文献(Molecular Endocrinology, 8, 1253-1261, 1994)に記載のROR応答性領域含有ポリヌクレオチドへのRev-ErbA β の結合量の変動を指標にしたスクリーニング方法を挙げることができる。なお、ここでROR応答性領域含有ポリヌクレオチドとは、ROR α 1がROR応答性遺伝子の発現制御に機能するために必要な遺伝子配列(ROR応答性領域5'-ATAACTAGGTCA-3')を含む配列領域を意味するものである。

【0178】具体的には、例えばウサギレティキュロサイトラーセトシステム(Promega)を用いてin vitroで作成されたRev-ErbA β と被験物質、およびDNA 5' End-Labeling System(Promega)を用いてin vitroで³²Pで標識された合成ROR応答性領域含有ポリヌクレオチドを混合し、室温で20分間保温した後、5%非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、上記Rev-ErbA β と標識ポリヌクレオチドとの結合反応産物に由来する標識シグナルを放射線検出器(BAS-1800II、富士フィルム社製)で検出、測定する。制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には被験物質を添加した場合の上記結合反応産物の量(結合活性)が、被験物質を添加しない対照の当該量(結合活性)に比して、変動するか否かを指標として行うことができる。

【0179】(3) Selenoprotein Pの機能(活性)に基づくスクリーニング方法

本発明タンパク質の一つであるSelenoprotein Pは血漿

蛋白の一種でありselenocysteine残基をポリペプチドあたり10持つタンパク質である。ラットおよびヒト血漿におけるセレンウム量の50%以上を結合しているとされ、細胞外における抗酸化物質としての働きが予想されるがその生理的意義はまだ不明な点が多い(生化学73:261-264, 2001)。

【0180】Selenoprotein Pはglutathione peroxidase活性(GSH reductase存在下でのNADPHの酸化)を有することが知られている。従って、該タンパク質の公知の性質を利用することにより、Selenoprotein Pの機能(活性)を制御する制御物質または候補物質をスクリーニングすることができる。

【0181】Selenoprotein Pの活性測定は、例えば文献(新生物化学実験講座5「生体酸化・薬物代謝」287-288ページ東京化学同人1992)記載の方法により行うことができる。かかる方法として、具体的には下記の方法を例示することができる：自記分光光度計に一組のキュベットをセットし、それぞれに5mM EDTAを含む1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0) 0.1ml, 0.1Mグルタチオン(還元型, 用時調製) 0.02ml, 10単位/mlグルタチオンレダクターゼ(Sigma社製, Type2) 0.1ml, 2mM NADPH 0.1ml (用時調製), Selenoprotein P 0.01ml, 蒸留水0.66 mlを添加する。37℃で2分間反応後、基質(7mM ϵ -ブチルヒドロペルオキシド) 0.01mlをキュベットに加えて、340nmにおける吸光度の減少をレコーダーに記録する。NADPHの吸光係数 $6.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて計算し、1分間当たり $1 \mu\text{mol}$ のNADPHを消費する酵素量を1単位とする。グルタチオンと ϵ -ブチルヒドロペルオキシドによるNADPHの非酵素的酸化反応を補正するために、酵素溶液を除いたブランク測定を行い、これを差し引く。

【0182】また、文献(J Biol Chem 274:2866-71, 1999)記載の測定方法によりSelenoprotein Pの活性測定を行うこともできる。具体的には下記の方法を例示することができる：トータル1mlの容量で0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mM NADPH, 0.5 mM EDTA, 2mM グルタチオン, 1 unit グルタチオンレダクターゼ、5 μg Selenoprotein Pからなるバッファーで測定する。37℃で2分間ブレインキュベートしたのち基質(peroxide)を添加することにより反応を開始する。リン脂質水酸化物の場合はTriton X-100とdeoxycholateを適当な濃度添加して行う。NADPHの酸化のモニターは340 nm の波長で37℃で行う。

【0183】制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には前記反応系に被験物質を加えた水溶液、すなわちSelenoprotein P、グルタチオン、グルタチオンレダクターゼ、NADPH、glutathione peroxidaseに対する基質(peroxide)及び被験物質を含む水溶液におけるglutathione peroxidase活性が、被験物質を添加しない対照水溶液の当該活性レベルに比して、変動するか否かを指標として行うことができる。

【0184】(4) Aquaporin 1の機能(活性)に基づくスクリーニング方法

本発明タンパク質の一つであるAquaporin (AQP) と称する一群の膜タンパク質は、水透過性活性(水チャンネル活性)を有する膜タンパク質として単離されている。また現在までに、幾つかのAquaporinの遺伝子がクローニングされ、AQP1~8等のアクアポリンが発見されている(Am. J. Physiol. 270., C12-C30, 1996)。従って、該タンパク質の公知の性質、すなわちAquaporin 1の水透過性活性を利用することにより、Aquaporin 1の機能(活性)を制御する制御物質または候補物質をスクリーニングすることができる。

【0185】Aquaporin 1の水透過性活性の測定は、例えば文献(Science, 256, 385-387(1992))記載の方法、すなわち、AQPファミリーの遺伝子が発現している

$$\text{透過性 (cm/sec)} = [(V40 - V20) / 20] / [(A20 \times 10^{-2} \times 4) \times 1.384]$$

【0187】なお式中、V20は、20秒後の卵母細胞の体積(cm^3)を表し、V40は、40秒後の卵母細胞の体積(cm^3)を表し、A20は、20秒後の卵母細胞の断面積(mm^2)を表す。

【0188】制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には被験物質を添加した前記細胞における水透過性活性が、被験物質を添加しない対照細胞の当該活性レベルに比して変動するか否かを指標として、好ましくは低下(抑制)するか否かを指標として、行うことができる。

【0189】(5) BMP-3bの機能(活性)に基づくスクリーニング方法

マウスの頭蓋冠由来の前骨芽細胞株であるMC3T3細胞は骨芽細胞に分化することが知られており、その過程は本発明タンパク質の一つであるBMPによって促進される。骨芽細胞への分化の指標としては、アルカリホスファターゼ(ALPase)活性の上昇、およびコラーゲン合成活性の上昇が知られている(蛋白、核酸、酵素33, No.2, 186, 1988)。従って、該タンパク質の公知の性質に基づいて、BMP-3bの機能(活性)を制御する制御物質または候補物質をスクリーニングすることができる。

【0190】BMP-3bの活性測定は、例えばBMP-3bを、未分化間葉系細胞や前骨芽細胞株(例えばMC3T3-E1)に作用させ、アルカリ性ホスファターゼ活性またはコラーゲン合成量の変化を測定することで行うことができる。具体的には、下記の方法を例示することができる：BMP-3bを各種濃度で含んでいる10%新生子ウシ血清含有アルファMEM培地に、MC3T3-E1細胞(理研CellBank)を 1×10^4 細胞/mlの濃度で懸濁し、24穴マルチプレートの各穴に1mlずつ接種する。その後は3日毎に培地交換を行う。培養終了後、培地を除去し、1mlのPBSで細胞を洗浄する。これに0.05%トリトン-X、2mM MgCl_2 溶液を1穴あたり500 μl 加え、細胞を遊離させた後ピペッティング操作により懸濁させる。15ml遠心分離チューブ(住友ベークライト社製)に細胞懸濁液を移し、30秒間超音波装置にか

いことが知られているアフリカツメガエルの卵母細胞にRNAを導入した後、低張な培養液中における卵母細胞の表面積及び体積変化から水透過性を算出する方法により行うことができる。当該方法は具体的には下記の方法により実施することができる：ヒトAquaporin 1 RNA (10ng)をマイクロインジェクションしたアフリカツメガエル卵母細胞を、等張な培養液(約200mOsm)中、20°Cで3日間培養する。この培養卵母細胞を低張な培養液(約40mOsm)中へ移動する。移動20秒後及び40秒後に写真撮影を行い、画像解析装置を用いて卵母細胞の断面積及び体積を求める。膜タンパクの水透過性は、下記の式により算出する。

【0186】

【数1】

け、細胞を破碎する。これを1000r.p.m.、4分間遠心分離機にかけ、得られた上澄を酵素活性の測定に使用する。

【0191】アルカリ性ホスファターゼ活性を指標として上記酵素活性を測定する方法は、アルカリ性ホスファターゼテストワコー(和光純薬社製)を用いてBessey-Lowry法を基にして行う。遊離したp-ニトロフェノールの量 $\mu\text{mol/min/タンパク質 (mg)}$ で酵素活性が示される。すなわち、基質緩衝液(0.1M炭酸塩緩衝液 pH9.8, 2mM MgCl_2 , 10mM p-ニトロフェノール) 0.5mlを試験管に入れ、3分間37°Cにて予備加温する。これに上記で調製した上澄0.5mlを加え、37°Cにて30分間加温する。反応系に0.02N 水酸化ナトリウムを2ml加えて反応を停止させ、この溶液を24穴マルチプレートの各穴に1ml分注し、波長415nmの濁度を測定し、検量線から活性値を求める。

【0192】この場合、制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には被験物質を添加した前記細胞由来のアルカリ性ホスファターゼ活性が、被験物質を添加しない対照細胞由来の当該活性レベルに比して、変動するか否かを指標として実施することができる。

【0193】またコラーゲン合成活性を指標として上記酵素活性を測定する方法は、SIRCOL社製コラーゲンアッセイキットを用いてコラーゲン合成量を測定することにより行うことができる。具体的には、24穴マルチプレートにて培養したMC3T3-E1細胞の培養上清を除去し、1mlのPBSで洗浄する。これに1穴あたり100 μl の0.5M酢酸溶液を加え、細胞内のコラーゲンを溶出させる。これにさらに250 μl の発色試薬(5%ピルビン酸、0.1%Direct Red)を加え、細胞の残骸を取らないようにして上清300 μl を15ml遠沈管に取り、30分間振とうする。この遠沈管を遠心分離器にかけ(1550r.p.m.、4分間)上清を除去する。遠沈管内に残った赤い沈殿物にエタノール500 μl を加え、再度遠心分離器にかけて上清を除去する。得られた沈殿物に0.5M水酸化ナトリウムを1ml加えた後、各検体を200 μl ずつ96穴マルチプレートに分注する。マイク

ロプレートリーダーにて波長550nmの濁度を測定し、検量線によりコラーゲン量を読み取る。

【0194】この場合、制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には被験物質を添加した前記細胞由来のコラーゲン合成活性が、被験物質を添加しない対照細胞由来の当該活性レベルに比して、変動するか否かを指標として実施することができる。

【0195】(6) FK506-binding protein 1Aの機能(活性)に基づくスクリーニング方法
本発明タンパク質の一つであるFK506-binding protein 1AはFK506に結合する細胞蛋白質で、ペプチジルプロリルイソメラーゼ活性(以下PPIアーゼ活性ともいう)を有する。FK506のFK506-binding proteinへの特異的結合はタンパク質のイソメラーゼ活性の阻害やT細胞の増殖阻害を引き起こすことが報告されている(Nature., 341, 758, 1989)。従って、該タンパク質の公知の性質を利用することにより、FK506-binding protein 1Aの機能(活性)を制御する制御物質または候補物質をスクリーニングすることができる。

【0196】FK506-binding protein 1Aの活性測定は、例えば文献(Biochemistry., 30, 6127, 1991)記載の方法にて実施することができる。以下、このアッセイの原理につき記述する。

【0197】このアッセイの基本的原理は、基質のシス異性体からトランス型への転化であり、この転化はPPIアーゼにより触媒される。P2位置にプロリンを含有するペプチドのキモトリプシンの基質は、Phe-Pro結合がトランス異性体の立体配置にあるとき、キモトリプシンによってのみ切り離される。過剰のキモトリプシンの存在下に、トランスペプチド異性体のすべてはほぼ5秒以内に切り離され、シス型のみが残る。シスペプチドは自発的にトランス型にゆっくりした速度で転化する。シスからトランスへの転化はこの自発的転化より非常に速い速

$$\text{阻害率(\%)} = [1 - (\text{kobs} - \text{kuncat}) / (\text{kuninh} - \text{kuncat})] \times 100$$

【0202】ここでkobsは選抜した被験物質の存在下の速度であり、kuncatは酵素の不存在下の速度であり、そしてkuninhは酵素の存在および被験物質の不存在下の速度である。

【0203】制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には被験物質を添加した場合の上記酵素活性が、被験物質を添加しない対照の当該活性レベルに比して変動するか否かを指標として、好ましくは低下(抑制)するか否かを指標として、行うことができる。

【0204】また、FK506-binding protein 1Aの機能(活性)を制御する制御物質または候補物質の別のスクリーニング方法として、文献(J Biol Chem, 267, 30, 21753-21760, 1992)に記載のFK506-binding protein 1AのFK506への結合量の変動を指標にしたスクリーニング方法を挙げることができる。具体的には、下記の方法を例示することができる：すなわち、TSKバッファ

度で起こる。PPIアーゼ活性をもつタンパク質はこのようなイソメラーゼの例である。

【0198】ペプチドがPPIアーゼによりトランス型へ転化すると、ペプチドはキモトリプシンにより切り離され、p-ニトロアニリンを解放する。このp-ニトロアニリンを390nmにおいてモニターする。次いで、エンズフィッター(ENZFITTER)プログラム〔レザーバロウ(Leatherbarrow)、バイオソフト(BIOSOFT)、英国ケンブリッジ〕を利用して第1次速度+オフセット方程式を使用して、解放速度を計算する。

【0199】以上の原理に基づき、実際に被験物質によるPPIアーゼ阻害効果の有無を測定するには、例えば以下の方法により行うことができる。すなわち、950μlの水冷アッセイ緩衝液(25mMのHEPES, pH7.8, 100mMのNaCl)、10μlのFK506-binding protein 1A (10mMのトリス-HCl pH7.5中の2.5μM, 100mMのNaCl、1mMのジチオスレイトール)、25μlのキモトリプシン(1mMのHCl中の50mg/ml)および10μlのジメチルスルホキシドを含むプラスチックのキューベット中に種々の濃度の被験物質を添加する。5μlの基質(スクシニル-Ala-Phe-Pro-Phe-パラ-ニトロアニリド、5mg/ml、トリフルオロエタノール中の235mMのLiCl中)を添加することによって、この反応を開始する。

【0200】390nmにおける吸収/時間は、ベックマン(Beckman)DU70分光光度計を使用して90秒間モニターする。吸収/時間のデータのファイルをIBM XTコンピューターに移し、そして商用エンズフィッター(Enzfitter)プログラムを使用して速度定数を決定する。データの各組について、触媒を使用しない転化速度を測定し、そして阻害されない酵素の速度を決定する。データを阻害%として表し、そして次のようにして決定する：

【0201】

【数2】

(20mM リン酸ナトリウム(pH6.8), 50mM 硫酸ナトリウム, 5mM β-メルカプトエタノール, 1mM EDTA)に懸濁した45μgのBio-Gel P-6DG (BioRad)と、1μgのFK506-binding protein 1A、被験物質、および50nMのトリチウム標識したジヒドロFK506(標識FK506)を混合後、Sephadex LH-20 (Amersham) ゲルろ過法によりフリーの標識FK506を除去し、FK506-binding protein 1Aと標識FK506との結合生産物に由来する標識シグナルを液体シンチレーションカウンターにより測定する。

【0205】制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には被験物質を添加した場合のFK506-binding protein 1Aと標識FK506との結合生産物量(結合活性)が、被験物質を添加しない対照の当該量(結合活性)に比して変動するか否かを指標として、好ましくは低下(抑制)するか否かを指標として、行うことができる。

【0206】(7) Apolipoprotein Eの機能(活性)に基づくスクリーニング方法

本発明タンパク質の一つであるApolipoprotein Eは血漿中や脳内で脂質を運搬する蛋白として重要な因子である。またApolipoprotein Eはアミロイドβ蛋白と結合して、アルツハイマー病の発症や進展に影響を与えていることが知られている。よって、Apolipoprotein Eの受容体への結合活性(例えば、結合阻害の有無)を指標とすることにより、Apolipoprotein Eの機能(活性)を制御する制御物質または候補物質をスクリーニングすることができる。

【0207】Apolipoprotein Eの受容体への結合活性測定は、例えば文献(J Biol Chem, 257:261:4256-4267, 1986)記載の方法に従って実施することができる。具体的には、下記に記載する方法を例示することができる: まず¹²⁵I標識ヒトApolipoprotein Eの調製は、精製ヒトApolipoprotein E(バイオジェネシス社)、IODO-BEADS Iodination Reagent(ピアス)、キャリアフリー¹²⁵I(アマシャムファルマシア)を用いてキットに記載のプロトコールにて実施する。Apolipoprotein E受容体を含む膜画分の調製は、ヒト肝由来細胞株HepG2(アメリカンタイプカルチャーコレクション)を50mM Tris-HCl (pH7.5), 25mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM phenylmethylsulfonyl-fluoride(シグマ), 0.1mM leupeptinを含むバッファー中、ホモゲナイザーにて破碎し、100,000rpm、4℃にて1時間遠心後、不溶性画分を回収することにより実施する。

【0208】標識Apolipoprotein Eの膜画分(受容体)への結合は、以下の方法にて実施することができる。すなわち、50mM Tris-HCl (pH7.5), 25mM NaCl, 1mM CaCl₂, 20mg/ml ウシ血清アルブミン(シグマ)の反応バッファー中にて、200μgの膜画分、¹²⁵I標識Apolipoprotein Eを混和後、4℃にて1時間保温する。次に、膜画分と標識Apolipoprotein Eの複合体をセルロースアセテートフィルター(ミリポア)でろ過することによって得たのち、γカウンターにて放射活性を測定する。非特異的結合として20mM EDTA存在下での放射活性を差し引くことにより、膜画分(受容体)へのApolipoprotein Eの特異的結合活性を測定する。

【0209】制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には被験物質を添加した場合の前記細胞膜画分(受容体)におけるApolipoprotein E結合活性が、被験物質を添加しない対照細胞膜画分(受容体)の当該活性レベルに比して、変動するか否かを指標として行うことができる。

【0210】(8) Acyl-CoA synthetase 5の機能(活性)に基づくスクリーニング方法

本発明タンパク質の一つであるAcyl-CoAは脂肪酸代謝や細胞増殖に非常に重要であることが知られている。脂肪細胞前駆細胞として知られる3T3-L1が増殖時に発現が亢

進していること、脂肪酸によるグリオーマ増殖の作用機構の一端を担っていることが示されている(Oncogene 19: 5919-25, 2000)。Acyl-CoA synthetase (ACS)は脂肪酸とCoAを接合しAcyl-CoAを合成する酵素であるため、この公知の酵素学的作用に基いて、Acyl-CoA synthetase 5の機能(活性)を制御する制御物質または候補物質をスクリーニングすることができる。

【0211】Acyl-CoA synthetase 5の活性の測定は、例えば文献(新生化学実験講座4「脂質I中性脂質とリポタンパク質」43-44ページ東京化学同人1993)記載の方法に従って実施することができる。具体的には下記の方法を例示することができる: 40mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5), 1mM ATP, 2mM MgCl₂, 2mM EDTA, 1% (w/v) Triton X-100, 0.2mM パルミチン酸(Na塩), 0.5mM CoASHおよび酵素液(Acyl-CoA synthetase 5)を含む(全量1.0ml)反応液1、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5), 1mM N-エチルマレイミド, 2.25mM 4-アミノアンチピリン, 0.5% (w/v) NaN₃, 0.00375% (w/v) 3-メチル-N-エチル-N-(2-ヒドロキシエチル)アニリン, 10単位ペルオキシダーゼ, 12単位アシルCoAオキシダーゼ(全量2.0ml)からなる反応液2、を用意し、反応液1の酵素液以外の成分を含む溶液をあらかじめ37℃に保温しておく。この溶液に酵素液を加えて反応を開始し、10分後に反応液2を加えて反応を停止する。この混合液を37℃、5分間反応したのち、550nmの吸光度を測定する。

【0212】またAcyl-CoA synthetase 5の活性は、文献(J Biol Chem 276: 24667-73, 2001)記載の方法によっても測定することができる。当該方法としては下記の方法を例示することができる: 200μlの下記組成の反応バッファー(50 μM [³H]palmitate in Triton X-100, 1 μM EDTA, 10 mM ATP, 250 μM CoA, 175 mM Tris (pH 7.5), 8 mM MgCl₂, 及び 5 mM Dithiothreitol) (但しTriton X-100の最高濃度は0.03%) に対して、0.5-1.0 μg のAcyl-CoA synthetase 5を添加する。ACS活性測定は37℃で5分間インキュベートしたのち文献(Anal Biochem., 73: 1-8, 1976)記載の方法で行うことができる。

【0213】制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には前述する反応系に被験物質を加えた水溶液、すなわちAcyl-CoA synthetase 5、脂肪酸(パルミチン酸等)、CoA及び被験物質を含む水溶液におけるAcyl-CoA 合成活性が、被験物質を添加しない対照水溶液の当該活性レベルに比して、変動することをもって行うことができる。

【0214】(9) Epoxide hydrolase 1の機能(活性)に基づくスクリーニング方法

本発明タンパク質の一つであるEpoxide hydrolaseはポリ環状芳香族炭化水素などの外来化合物の代謝に関わる酵素である(J Biol Chem 268: 6402-6407, 1993)。従って、該タンパク質の当該公知の酵素活性を利用するこ

とにより、Epoxide hydrolase 1の機能(活性)を制御する制御物質または候補物質をスクリーニングすることができる。

【0215】Epoxide hydrolaseは、例えば文献(J. Biol. Chem., 276, 14867, 2001)記載の方法に従ってヒト冠動脈細胞から調製することができ、またEpoxide hydrolaseの活性もまた上記文献記載の方法にて測定することができる。

【0216】具体的にはEpoxide hydrolase活性は、文献(Anal. Biochem., 231, 188, 1995)に記載される該酵素に選択的な基質である racemic [^3H]trans-1,3-diphenylpropene oxide (以後tDPPPOと記す。)を用いて測定することができる。5mM [^3H]tDPPPO dimethylformamide 溶液(50mCi/mmol) 1 μl と0.1mg/mlとなるようにalbuminを添加したEpoxide hydrolase 1 100 μl を30℃にて15分間保温した後、methanol 60 μl およびisooctane 200 μl を添加することにより反応を停止させる。これらの溶媒の添加により、水相より残余のepoxideを抽出し、液体シンチレーションカウンターを用いて水相中に存在する放射性diolを定量することにより、Epoxide hydrolase 1の活性を測定する。

【0217】制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には前記反応系に被験物質を加えた水溶液、すなわちEpoxide hydrolase 1、基質(tDPPPOなど)及び被験物質を含む水溶液におけるEpoxide hydrolase活性が、被験物質を添加しない対照水溶液の当該活性レベルに比して変動するか否かを指標として、好ましくは低下(抑制)するか否かを指標として、行うことができる。

【0218】(10) Glutamine synthaseの機能(活性)に基づくスクリーニング方法
本発明タンパク質の一つであるGlutamine synthetaseはグルタミン酸のグルタミンへの変換を触媒する酵素であり、生じたグルタミンは血漿中で遊離され、肝臓および腎臓に運ばれたのち、糖新生、尿素の生合成、および窒素の排出に利用される(Anal. Biochem., 289, 18, 2001)。該タンパク質の当該公知の酵素学的作用を利用することによって、Glutamine synthetaseの機能(活性)を制御する制御物質または候補物質をスクリーニングすることができる。

【0219】Glutamine synthetaseの活性測定は、例えば文献(Anal. Biochem., 289, 18, 2001)記載の方法にて実施することができる。具体的には、下記の方法を例示することができる：ラットL6細胞(アメリカンタイプカルチャーコレクション)を96ウェルプレートに1ウェル当たり50000細胞撒き、200 μl の完全培地(グルタミン、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有DMEM培地)にて一晚培養する。2日目、完全培地を除去し、誘導培地1(グルタミン不含、10%チャコール/デキストラン処理ウシ胎仔血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有DMEM培地)を添加する。3日目、培地

を除去し、誘導培地2(グルタミン不含、1%チャコール/デキストラン処理ウシ胎仔血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有DMEM培地)を添加する。4日目、培地を除去し、細胞を200 μl のPBSで2回洗浄後、40 μl の50mMイミダゾール(pH6.8)を加え、凍結融解により細胞を溶解する。40 μl のアッセイミックス(50mM arsenic acid, 0.32mM ADP, 100mM L-glutamate, 50mM hydroxylamine, 4mM MnCl_2)を細胞溶解液に添加し、37℃で30分間保温する。80 μl のferric chrolide反応停止液を加え、反応を停止させた後、プレートを2000rpmで5分間遠心し、上清を新しい96ウェルプレートに回収し、マイクロプレート対応分光光度計にて540nmの吸光度を計測することにより、Glutamine synthetase活性を測定する。

【0220】制御物質または候補物質のスクリーニングは、具体的には前記反応系に被験物質を加えた水溶液、すなわちGlutamine synthase、グルタミン酸及び被験物質を含む水溶液におけるGlutamine 合成活性が、被験物質を添加しない対照水溶液の当該活性レベルに比して変動するか否かを指標として、好ましくは低下(抑制)するか否かを指標として、行うことができる。

【0221】上記スクリーニング方法によって選別される制御物質の中から、さらに軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質を選別する方法としては、従来公知である如何なる選別方法をも用いることができるが、前述するように、ヒト軟骨様細胞株SW1353(ATCC)あるいはヒト滑膜細胞株SW982(ATCC)を用いて、軟骨破壊因子であるMMP(例えばMMP13)の産生量の変動を指標にして評価する方法をあげることができる。

【0222】また、本発明のスクリーニング方法を実施する前に、上記に掲げる各本発明タンパク質をコードする遺伝子について、あらかじめ実験により、該遺伝子の発現を抑制する物質が軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分(候補物質)として有用なのか、また発現を誘導する物質が軟骨障害の改善薬または治療薬の有効成分(候補物質)として有用なのかを判断することは可能であり、その具体的な方法については前述の通りである。当該実験によって本発明遺伝子の発現抑制物質が候補物質になる可能性が高いと判断された場合は、当該遺伝子がコードする本発明タンパク質の機能(活性)の抑制を指標としてスクリーニングを行うことにより、より高い精度で候補物質を選別することができ、また当該実験によって本発明遺伝子の発現誘導物質が候補物質になる可能性が高いと判断された場合は、当該遺伝子がコードする本発明タンパク質の機能(活性)の亢進を指標としてスクリーニングを行うことにより、より高い精度で候補物質を選別することができる。

【0223】上記(3-1)または(3-2)に記載する本発明のスクリーニング方法および上記さらなる選別によって選別された制御物質または候補物質は、さらに軟骨障害のモデル動物、すなわち十字靭帯切断モデル動物や半月板

切除モデル動物、あるいはコラゲナーゼ注入モデル動物などを用いた薬効試験、安全性試験、さらに軟骨障害に罹患した患者への臨床試験に供してもよく、これらの試験を実施することによって、より実用的な軟骨障害の改善または治療薬を取得することができる。このようにして選別された物質は、さらにその構造解析結果に基づいて、化学的合成、生物学的合成（発酵）または遺伝子学的操作によって、工業的に製造することができる。

【0224】なお実施例に記載のように、ヒト変形性関節症患者の障害軟骨を含む関節組織において、正常関節組織と比較して発現上昇していた Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子およびGlutamine synthase遺伝子は全て、ラット十字靱帯切断モデルの障害軟骨組織においても共通に発現上昇していた。このように当該ラット十字靱帯切断モデルは、ヒト変形性関節症患者における遺伝子発現変動を反映した好ましいモデル動物であり、前記各スクリーニング方法によって選別された候補物質のさらなる絞り込みや、候補物質による本発明遺伝子の発現抑制を確認するための評価用モデルとして、有効に使用することができる。

【0225】なおラット十字靱帯切断モデルは、特開2001-131073、または、Arthritis & Rheumatism 43, (9), 2121-2131 (2000) に記載の方法により作製することができる。具体的には、6週齢以上のラット後肢膝関節部の皮膚および膝蓋靱帯、滑膜をメスで切開し、切開した部分より関節腔内の前十字靱帯を切断する。切開した皮膚は外科用クリップで留める等の処置をし、その後は通常の飼育を数日間行う。その後、被験動物を屠殺し、大腿骨、脛骨の関節軟骨部分サンプルを採取する。

【0226】変形性関節症様の軟骨変性等の症状について、通常は、組織標本を作製してサフラニン0の染色性およびトルイジンブルーまたはアルシアンブルーの異染色性等を指標にして評価することができる。具体的には、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、脱灰、脱水、透徹を経て、パラフィン包埋し、矢状面に薄切する。その後、通常のパラフィン除去を行った後サフラニン0とファーストグリーンまたはトルイジンブルーまたはアルシアンブルーで染色を行う。

【0227】(4) 軟骨障害の改善・治療剤
本発明は、軟骨障害の改善・治療剤を提供するものである。すなわち、本発明は変形性関節症、軟骨形成異常症、変形性椎間板症、軟骨の欠損、軟骨損傷、半月板損傷、骨折の修復・治癒不全といった軟骨障害の改善・治療剤、および軟骨細胞移植時の補助療法剤を提供するものである。

【0228】本発明はAcetyl-Coenzyme A acetyltransf

erase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子の発現が軟骨障害と関連しているという新たな知見から、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子（配列番号1）、Rev-ErbA β 遺伝子（配列番号3）、Selenoprotein P遺伝子（配列番号5）、Aquaporin 1遺伝子（配列番号7）、BMP-3b遺伝子（配列番号9）、FK506-binding protein 1A遺伝子（配列番号11）、Apolipoprotein E遺伝子（配列番号13）、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子（配列番号15）、Epoxide hydrolase 1遺伝子（配列番号17）またはGlutamine synthase遺伝子（配列番号19）の発現を制御（抑制／亢進）する物質、あるいは、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1（配列番号2）、Rev-ErbA β （配列番号4）、Selenoprotein P（配列番号6）、Aquaporin 1（配列番号8）、BMP-3b（配列番号10）、FK506-binding protein 1A（配列番号12）、Apolipoprotein E（配列番号14）、Acyl-CoA synthetase 5（配列番号16）、Epoxide hydrolase 1（配列番号18）またはGlutamine synthase（配列番号20）の機能（活性）を制御（抑制／亢進）する物質が、上記疾患の改善または治療に有効であるという考えに基づくものである。すなわち、本発明の軟骨障害の改善・治療剤は前記本発明遺伝子の発現を制御する物質、あるいは前記本発明タンパク質の機能（活性）を制御する物質を有効成分とするものである。

【0229】当該有効成分となる本発明遺伝子の発現制御物質、あるいは本発明タンパク質の機能（活性）制御物質は、上記のスクリーニング方法を利用して選別されたもののみならず、選別された物質に関する情報に基づいて常法に従って工業的に製造されたものであってもよい。

【0230】軟骨障害の改善・治療剤の有効成分となり得る本発明遺伝子の発現制御物質、あるいは本発明タンパク質の機能（活性）制御物質としては、具体的にはEpoxide hydrolase 1の遺伝子発現抑制物質または機能（活性）抑制物質、Glutamine synthaseの遺伝子発現抑制物質または機能（活性）抑制物質、Aquaporin 1の遺伝子発現抑制物質または機能（活性）抑制物質、あるいはFK506-binding protein 1Aの遺伝子発現抑制物質または機能（活性）抑制物質が例示される。

【0231】ここでEpoxide hydrolase 1の遺伝子発現抑制物質または機能（活性）抑制物質としては、具体的には既存のEpoxide hydrolase 1阻害剤であるvalproic acid、valproyl hydroxamic acid、valproyl glycinamide、valproyl glycine、Elaidamide、Lipopolysaccharide (LPS)、GdCl₃ (GdCl₃·6H₂O)あるいはこれらの構造的類似物等を挙げることができる(Pharmaceutical Research, 17:216-21 (2000)、Chemical Research in Toxicology

y.14:409-15(2001)、Biochemical Pharmacology.56:142-7-36(1998)、Drug Metabolism & Disposition.25:1416-23(1997))。これらの物質は、例えば前記文献等に基づいて製造することができる。

【0232】またGlutamine synthaseの遺伝子発現抑制物質または機能(活性)抑制物質としては、具体的には既存のGlutamine synthase阻害剤であるmethionine sulfoximine (MSO)、Phosphinothricin、あるいはこれらの構造的類似物等を挙げることができる(Brain Research Bulletin.57:11-5(2002)、Biochemistry. 40:1903-12(2001))。これらの物質は、例えば前記文献等に基づいて製造することができる。

【0233】またAquaporin 1の遺伝子発現抑制物質または機能(活性)抑制物質としては、具体的には既存のAquaporin 1阻害剤であるP-chloromercuribenzenesulphonate (pCMBS)、CuSO₄、phloretin、HgCl₂、あるいはこれらの構造的類似物等を挙げることができる(Pflugers Archiv - European Journal of Physiology.431:408-14(1996)、Plant Cell.14:727-39(2002))。これらの物質は、例えば前記文献等に基づいて製造することができる。

【0234】またFK506-binding protein 1Aの遺伝子発現抑制物質または機能(活性)抑制物質としては、具体的には既存のFK506-binding protein 1A阻害剤であるFK506、rapamycin、ascomycin、506BDあるいはこれらの構造的類似物等を挙げることができる(Nature 341, No.6244:755-57(1989)、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 88, No.5:1948-52(1991)、Science, 250, No.4980:556-59(1990)、Science, 248, No.4957:863-66(1990)、US6,239,146、US6,228,872、US6,096,762、US5,665,774、US5,622,970、US5,516,797、US5,330,993、US5,192,773、EP1,098,897、EP584,223、EP537,269、EP587,756、W00027811、W00004020、W09962511、W09221313、W09219593、W09204370、W09200278、特開2000-204048、特開2000-169444)。これらの物質は、例えば前記文献等に基づいて製造することができる。

【0235】本発明遺伝子の発現制御物質、あるいは本発明タンパク質の機能(活性)制御物質は、そのままもしくは自体公知の薬学的に許容される担体(賦形剤、増量剤、結合剤、滑沢剤などが含まれる)や慣用の添加剤などと混合して医薬組成物として調製することができる。当該医薬組成物は、調製する形態(錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤などの経口投与剤;注射剤、点滴剤、外用剤、坐剤などの非経口投与剤)等に応じて経口投与または非経口投与することができる。また投与量は、有効成分の種類、投与経路、投与対象または患者の年齢、体重、症状などによって異なり一概に規定できないが、1日投与用量として、数百mg〜2g、好ましくは数十mg程度を、1日1〜数回にわけて投与することができる。

【0236】また、上記の物質がDNAによりコードされるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。さらに、上記の物質が本発明のAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-Co A synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子またはGlutamine synthase遺伝子に対するアンチセンスヌクレオチド(アンチセンス核酸)の場合は、そのまま、若しくは遺伝子治療用ベクターに組み込むことにより、遺伝子治療を行うこともできる。これらの場合も、投与量、投与方法は患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

【0237】

【実施例】次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。しかし、本発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。

実施例1 ラット十字靭帯切断モデルの作製および軟骨採取

日本チャールス・リバー社より6週齢の雄性CD(SD)IGSを1週間おきに3回、合計100匹購入した。1週間予備飼育後外見上異常の認められない個体を実験に供した。

【0238】エーテル麻酔下でラット後肢膝関節部の毛をバリカンで剃り、80%エーテルで切開部分を消毒した。後肢を屈曲した状態で関節腔部分の皮膚および膝蓋靭帯、滑膜をメスで5mm程度切開した。切開した部分よりマイクロ剪刀を関節腔内に差し入れ、前十字靭帯を切断した。切開した皮膚は外科用クリップで留めた。処置後は通常の飼育を行った。対照は無処置とした。

【0239】処置1、2、3週間後に過剰エーテル麻酔下で安楽死させ、心拍の停止を確認した後、大腿骨、脛骨の関節軟骨部分のみをメスでそぎ採取した。軟骨採取した後、ただちに凍結させた。各時点25匹使用した。対照は、処置2週間後の週齢とそろえた。

【0240】実施例2 ラット膝関節軟骨からのtotal RNAの調製

実施例1で採取したラット十字靭帯切断モデルの膝関節軟骨(以下、本明細書において「病態モデル軟骨」ともいう。)からtotal RNAを調製した。具体的には十字靭帯切断モデルを作製後、1、2、および3週間経過後の膝関節から採取した軟骨にTRIZOL(Gibco-BRL社製) 5ml添加し、ホモゲナイザーでつぶしてからそれぞれtotal RNAを調製した。なお、total RNAの調製は、TRIZOLを用いて付属のプロトコールに従って行った。得られたtotal RNAはDEPC処理水(ナカライテスク社製)に溶解した。

【0241】同様に、比較対照のため何も処理しないで飼育したラットの膝関節軟骨(以下、本明細書にお

いて「未処理軟骨」ともいう。) からtotal RNAを調製した。

【0242】実施例3 DNAチップ解析

実施例2で調製したtotal RNAを用いてDNAチップ解析を行った。なお、DNAチップ解析はAffymetrix社Gene Chip Rat Genome U34Aを用いて行った。具体的には、解析は、(1) total RNAからcDNAの調製、(2) 該cDNAからラベル化cRNAの調製、(3) ラベル化cRNAのフラグメント化、(4) フラグメント化cRNAとプローブアレイとのハイブリダイズ、(5) プローブアレイの染色、(6) プローブアレイのスキャン、及び(7) 遺伝子発現解析、の手順で行った。

【0243】(1) total RNAからcDNAの調製

実施例2で得られた各total RNA 10 μ gとT7-(dT)24プライマー(Amersham社製)100pmolを含む11 μ Lの混合液を、70°C、10分間加熱した後、氷上で冷却した。冷却後、SuperScript Choice System for cDNA Synthesis(Gibco-BRL社製)に含まれる5 \times First Strand cDNA Buffer 4 μ L、該キットに含まれる0.1M DTT (dithiothreitol) 2 μ L、該キットに含まれる10mM dNTP Mix 1 μ Lを添加し、42°Cで2分間加熱した。更に、該キットに含まれるSuperScriptII RT 2 μ L(400U)を添加し、42°Cで1時間加熱した後、氷上で冷却した。冷却後、DEPC処理水 91 μ L、該キットに含まれる5 \times Second Strand Reaction Buffer 30 μ L、10mM dNTP Mix 3 μ L、該キットに含まれるE. coli DNA Ligase 1 μ L(10U)、該キットに含まれるE. coli DNA Polymerase I 4 μ L(40U)、該キットに含まれるE. coli RNaseH 1 μ L(2U)を添加し、16°Cで2時間反応させた。次いで、該キットに含まれるT4 DNA Polymerase 2 μ L(10U)を加え、16°Cで5分間反応させた後、0.5M EDTA 10 μ Lを添加した。次いで、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液(ニッポンジーン社製)162 μ Lを添加し、混合した。該混合液を、予め室温、14,000rpm、30秒間遠心分離しておいたPhase Lock Gel Light(エッペンドルフ社製)に移し、室温で14,000rpm、2分間遠心分離した後、145 μ Lの水層をエッペンドルフチューブに移した。得られた溶液に、7.5M酢酸アンモニウム溶液72.5 μ L、エタノール362.5 μ Lを加えて混合した後、4°Cで14,000rpm、20分間遠心分離した。遠心分離後、上清を捨て、作製したcDNAを含むペレットを得た。その後、該ペレットに80%エタノール0.5mLを添加し、4°Cで14,000rpm、5分間遠心分離した後、上清を捨てた。再度同様の操作を行った後、該ペレットを乾燥させ、DEPC処理水12 μ Lに溶解した。以上の操作から実施例2で調製した各total RNAから、各cDNAを取得した。

【0244】(2) cDNAからラベル化cRNAの調製

各cDNA溶液5 μ Lに、DEPC処理水17 μ L、BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit(ENZO社製)に含まれる10 \times HY Reaction Buffer 4 μ L、該キットに含まれる10 \times Biotin Labeled Ribonucleotides 4 μ L、該キットに

含まれる10 \times DTT 4 μ L、該キットに含まれる10 \times RNase Inhibitor Mix 4 μ L、該キットに含まれる20 \times T7 RNA Polymerase 2 μ Lを混合し、37°Cで5時間反応させて、ラベル化cRNAを調製した。反応後、該反応液にDEPC処理水60 μ Lを加えたのち、RNeasy Mini Kit(GIAGEN社製)を用いて添付プロトコルに従い、調製したラベル化cRNAを精製した。

【0245】(3) ラベル化cRNAのフラグメント化

各ラベル化cRNA 20 μ gを含む溶液に、5 \times Fragmentation Buffer(200mMトリス-酢酸 pH8.1(Sigma社製)、500mM酢酸カリウム(Sigma社製)、150mM酢酸マグネシウム(Sigma社製))8 μ Lを加えた反応液40 μ Lを、94°Cで35分間加熱した後、氷中に置いた。これによって、ラベル化cDNAをフラグメント化した。

【0246】(4) フラグメント化cRNAとプローブアレイとのハイブリダイズ

各フラグメント化cRNA 40 μ Lに、5nM Control Oligo B2(Amersham社製)4 μ L、100 \times Control cRNA Cocktail 4 μ L、Herring sperm DNA(Promega社製)40 μ g、Acetylated BSA(Gibco-BRL社製)200 μ g、2 \times MES Hybridization Buffer(200mM MES、2M [Na⁺], 40mM EDTA、0.02% Tween20(Pierce社製)、pH6.5~6.7)200 μ L、及びDEPC処理水144 μ Lを混合し、400 μ Lのハイブリカクテルを得た。得られた各ハイブリカクテルを99°Cで5分間加熱し、更に45°Cで5分間加熱した。加熱後、室温で14,000rpm、5分間遠心分離し、ハイブリカクテル上清を得た。

【0247】一方、1 \times MESハイブリダイゼーションバッファで満たしたRat Genome U34Aプローブアレイ(Affymetrix社製)を、ハイブリオープン(Affymetrix社製)内で、45°C、60rpmで10分間回転させた後、1 \times MESハイブリダイゼーションバッファを除去してプローブアレイを調製した。上記で得られたハイブリカクテル上清200 μ Lを該プローブアレイにそれぞれ添加し、ハイブリオープン内で45°C、60rpmで16時間回転させ、フラグメント化cRNAとハイブリダイズしたプローブアレイを得た。

【0248】(5) プローブアレイの染色

上記で得られたハイブリダイズ済みプローブアレイそれぞれからハイブリカクテルを回収除去した後、Non-Stringent Wash Buffer(6 \times SSPE(20 \times SSPE(ナカライテスク社製)を希釈)、0.01%Tween20、0.005%Antifoam0-30(Sigma社製))で満たした。次にNon-Stringent Wash BufferおよびStringent Wash Buffer(100mM MES、0.1M NaCl、0.01%Tween20)をセットしたGeneChip Fluidics Station 400(Affymetrix社製)の所定の位置にフラグメント化cRNAとハイブリダイズしたプローブアレイを装着した。その後染色プロトコルEuKGE-WS2に従って、1次染色液(10 μ g/mL Streptavidin Phycoerythrin (SAPE)(Molecular Probe社製)、2mg/mL Acetylated BSA、100mM MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic Acid)、1M NaCl(A

mbion社製)、0.05%Tween20、0.005%Antifoam0-30)、2次染色液(100 μ g/mL Goat IgG (Sigma社製)、3 μ g/mL Biotinylated Anti-Streptavidin antibody (Vector Laboratories社製)、2mg/mL Acetylated BSA、100mM ME S、1M NaCl、0.05%Tween20、0.005%Antifoam0-30)により染色した。

【0249】(6) プローブアレイのスキャン、及び(7) 遺伝子発現解析

染色した各プローブアレイをHP GeneArray Scanner(Affymetrix社製)に供し、染色パターンを読み取った。染色パターンをもとにGeneChip Workstation System(Affymetrix社製)によってプローブアレイ上の遺伝子の発現を解析した。次に、解析プロトコールに従ってNormalization、遺伝子発現の比較解析を行った。

【0250】**実施例4** 十字靱帯切断モデル関節軟骨を用いた変形性関節症での遺伝子発現の変動解析
十字靱帯切断後、1、2、及び3週間経過後の各関節軟骨における遺伝子発現量(average difference)を、未処理関節軟骨における発現量と、GeneChip Workstation System(Affymetrix社製)にある解析ツールComparison Analysisを用いて比較した。Comparison Analysisは解析プロトコールに基づいて行った。

【0251】これらの比較解析の結果から得られた、遺伝子発現の増減の判定(Diff Call)および発現変動倍率(Fold Change)の値から、発現変動遺伝子を選抜した。選抜方法は、各処理時間において、病態モデル軟骨での遺伝子発現量(averagedifference)が、未処理軟骨での遺伝子発現量と比較して、2倍以上の発現変動(Diff CallがIあるいはDの判定、かつFold Changeが2以下あるいは2以上)を示したプローブを選抜した。同様の解析をすべての処理時間における軟骨について行って、いずれかの処理時間において2倍以上の発現変動を示したプローブを選抜した。

【0252】選抜した該プローブの中から、さらに病態との相関が高いプローブを選抜した。具体的には、DNAチップ解析結果から得られる遺伝子発現量(average difference)を指標にして、病態モデル軟骨での遺伝子発現量(average difference)が時間の経過とともに発現

増の傾向にあるプローブを選抜した。

【0253】**実施例5** ヒト変形性関節症患者の膝関節組織とヒト正常膝関節組織での遺伝子発現の変動解析
ヒト変形性関節症患者の障害軟骨を含む膝関節組織1サンプルとヒトの正常な膝関節組織2サンプルからtotal RNAを調製し、得られたtotal RNAを用いてDNAチップ解析を行った。DNAチップ解析はAffymetrix社Gene Chip Human Genome U95A,B,C,D,Eを用いて、実施例3と同様な方法で行った。また実施例3及び4と同様に、遺伝子発現の比較解析から正常関節組織に比べ、変形性関節症患者の関節組織で1.5倍以上の発現変動を示したプローブを選抜した。

【0254】**実施例6** 病態モデル軟骨での発現変動と変形性関節症患者の関節組織での発現変動をともに示した遺伝子

実施例4において病態モデル軟骨で発現変動を示したラット遺伝子と、実施例5において変形性関節症患者の膝関節組織と正常膝関節組織での遺伝子発現の比較で変形性関節症患者の関節組織で特異的な発現変動を示したヒト遺伝子とから、共通の遺伝子を選抜した。これらのラット遺伝子とヒト遺伝子との対応付けは、遺伝子名、タンパク質名をもとに、あるいはHomologene(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>)を用いて行った。具体的には、DNAチップ解析結果から得られるFold Changeを指標にして、変形性関節症患者の膝関節組織でのFold Changeが1.5倍以上の発現変動を示したプローブで、かつ、ラット十字靱帯切除モデルの軟骨でのFold Changeが2倍以上の発現変動を示し、全ての処理時間において未処置軟骨の遺伝子発現量(average difference)より大きい発現量を示したプローブを選抜した。その結果、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子、およびGlutamine synthase遺伝子が選抜された。

【0255】

【表1】

塩基配列配列番号	アミノ酸配列配列番号	Human U95 プローブ名	遺伝子名	発現変動	変動倍率	Acc No
1	2	39678_at	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	up	2.0	D90228
3	4	35705_at	Rev-ErbA β	up	6.3	D16815
5	6	34363_at	Selenoprotein P	up	2.8	Z11793
7	8	36156_at	Aquaporin 1	up	4.0	NM_000385
9	10	41245_at	BMP-3b	up	29.3	NM_004962
11	12	853_g_at	FK506-binding protein 1A	up	9.3	M34539
13	14	608_at	Apolipoprotein E	up	3.8	K00396
15	16	52290_g_at	Acyl-CoA synthetase 5	up	1.9	NM_016234
17	18	59684_at	Epoxide hydrolase 1, microsomal	up	18.2	L25879
19	20	48872_at	Glutamine synthase	up	2.9	Y00387

【0256】表中、Human U95プローブ名は Human Genome U95 Chip におけるプローブ名を示す。また表中、変

動倍率は、Human Genome U95 Chipで解析した正常膝関節組織の遺伝子発現量を1とした場合における変形性関

節症患者の関節組織での遺伝子発現量を示す。また各遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を示す後記配列表の配列番号も合わせて示す。以上のように、これら10個の遺伝子は、正常な関節組織と比較して変形性関節症患者の障害軟骨を含む関節組織で発現上昇しており、またラット十字靭帯切断モデルの障害軟骨においても、正常軟骨と比較して発現上昇していた。さらにこれらの遺伝子の発現は、病態の進行に伴って増大する傾向を示した。これらの結果より、これら10遺伝子は軟骨障害を伴う疾患に関するマーカー遺伝子として応用可能な遺伝子であると考えられた。また、これらの遺伝子を用いることによって軟骨障害を伴う疾患を緩和、抑制する治療薬の候補薬をスクリーニングすることが可能であると考えられた。

【0257】実施例7 未分化間葉系細胞の軟骨細胞への分化に対するFK506-binding protein 1A阻害剤、Aquaporin 1阻害剤、Epoxide hydrolase 1阻害剤およびGlutamine synthase阻害剤の効果の測定

マウス未分化間葉系細胞ATDC5 (理研; RCB0565) は増殖条件 (5%ウシ胎児血清 (GIBCO) 含有 DME/F12培地 (シグマ)、5%CO₂、37℃) から分化条件 (5%ウシ胎児血清、10μg/mlウシインスリン (和光純薬)、10μg/mlヒトトランスフェリン (Boehringer Mannheim)、30nM sodium selenite (Sigma) 含有αMEM (GIBCO)、3%CO₂、37℃) にシフトさせることにより軟骨細胞に分化することが知られている (CELL STRUCTURE & FUNCTION, 25, 195-204, 2000)。また、軟骨細胞は未分化間葉系細胞と比較して酸性ムコ多糖合成活性が高いため、酸性ムコ多糖量を指標に軟骨細胞への分化程度を定量化することができる。そこで、これらの公知の性質に基いて、FK506-binding protein 1A阻害剤、Aquaporin 1阻害剤、Epoxide hydrolase 1阻害剤およびGlutamine synthase阻害剤の

酸性ムコ多糖産生促進率 (%)

最終濃度	FK-506	Phloretin	Valproic acid	GdCl ₃ ·6H ₂ O	L-Methionine sulfoximine
0μM	0	0	0	0	0
0.1μM	-2	0	6	0	-2
1.0μM	3	0	33	44	57
10μM	60	62	40	42	49

対照群と比較して10μM FK506で60%、10μM Phloretinで62%、10μM Valproic acidで40%、10μM GdCl₃·6H₂Oで42%、10μM L-methionine sulfoximineで49%と有意に酸性ムコ多糖量が増加した。

【0261】以上の結果から、FK506-binding protein 1Aの阻害剤FK506、Aquaporin 1の阻害剤Phloretin、Epoxide hydrolase 1の阻害剤Valproic acidおよびGdCl₃·6H₂O、Glutamine synthaseの阻害剤L-methionine sulfoximineは、いずれも軟骨分化促進作用を有することが明らかとなった。

【0262】実施例8 ラット十字靭帯切断モデルを用いたGlutamine synthase阻害剤、FK506-binding protei

軟骨細胞への分化に対する効果をスクリーニングした。

【0258】増殖条件で培養したATDC5細胞をDulbecco's Phosphate Buffered Saline (GIBCO) にて洗浄、Trypsin/EDTA (GIBCO) にて剥がした後、増殖培地で3×10⁵ cells/mlに懸濁し、24ウェルプレート (IWAKI) に各ウェルあたり1mlずつまいだ。増殖条件で2日間培養した後、分化誘導条件にシフトさせ、以後2日置きに培地交換をおこなった。阻害剤の効果の測定は、分化誘導時にFK506-binding protein 1Aの阻害剤としてFK506 (カルビオケム; カタログ番号342500)、Aquaporin 1の阻害剤としてPhloretin (シグマ; カタログ番号P7912)、Epoxide hydrolase 1の阻害剤としてValproic acid (和光純薬; カタログ番号227-01071) およびGdCl₃·6H₂O (和光純薬; カタログ番号078-02661)、Glutamine synthaseの阻害剤としてL-methionine sulfoximine (シグマ; カタログ番号M5379) を、それぞれ0.1μM、1μM、10μMの濃度で含有する分化培地を用いた点以外は上記と同様にして実施した。分化条件にて15日間培養した後、簡易型・酸性ムコ多糖定量キット (ホクドー; カタログ番号OP03) を用いて、軟骨細胞から酸性された酸性ムコ多糖量を波長650nmの吸光度 (OD₆₅₀) で測定することにより、阻害剤の軟骨細胞への分化に対する効果を定量した。対照群として化合物を含有しない分化誘導条件群を設定し、この対照群との比較により、以下の算式にて薬効を評価した。

【0259】

【数3】

$$\text{酸性ムコ多糖増加率 (\%)} = 100 \times [(A/C) - 1]$$

A = 実験群における吸光度 (600nm)

C = 対象群における吸光度 (600nm)

【0260】結果を表2に示す。

【表2】

n 1A阻害剤およびAquaporin 1阻害剤の効果の測定

ラット十字靭帯切断変形性関節症モデルを用いて、Glutamine synthase阻害剤、FK506-binding protein 1A阻害剤およびAquaporin 1阻害剤の薬効スクリーニングを実施した。

【0263】7週齢のCrj:CD (SD) IGS (SPF) 系雄ラットを用い、実施例1に記載の方法により変形性関節症モデルを作製した。Glutamine synthase阻害剤であるL-methionine sulfoximine (シグマ; カタログ番号 M5379)、FK506-binding protein 1A阻害剤であるFK506 (プログライフ注射剤 5mg, Lot No. 5A8016A、藤沢薬品工業)、Aquaporin 1の阻害剤Phloretin (和光純薬; カタログ番号

160-17781) のN-メチル-D-グルカミン塩酸塩 (以下Phloretin塩と記載) を、十字靱帯切断手術後7~27日まで隔日で11回、膝関節腔内投与 (0.05mL/body) した。最終投与の翌日にモデル作製部位である左側膝関節を摘出し、大腿骨及び脛骨の内側及び外側顆の関節軟骨病変を病理組織学的に評価した。L-Methionine sulfoximineおよびFK506の対照群 (対照群1) として生理食塩液 (大塚生食注、Lot No.K2C85, 大塚製薬) 投与群、Phloretin塩対照群 (対照群2) としてN-メチル-D-グルカミン塩酸塩 (東京化成: カタログ番号M0713) 投与群を設定し、これら対照群との比較により薬効を評価した。

【0264】病理組織学的評価は、図1に示した評価基準 (菊地ら: 応用薬理, 44, 547-557 (1992) に基づく) により行った。

【0265】すなわち軟骨病変の指標である各関節軟骨の構造変化 (評点0~10)、浅在帯細胞変化 (評点0~2)、中間帯及び深在帯細胞変化 (評点0~10)、サフラニンO染色性低下 (評点0~4) 及びパンヌス形成 (評点0~3) をそれぞれ評価し、その合計評点 (最大29点) を算出して行った。

【0266】対照群1では、大腿骨関節軟骨の外側顆及び内側顆で合計評点が5.1及び12.0、脛骨関節軟骨の外側顆及び内側顆で合計評点が6.4及び10.0の軟骨病変が認められた。これら変化を示した対照群1と比較し、L-Methionine sulfoximine投与群では大腿骨関節軟骨の外側顆及び内側顆で合計評点がそれぞれ2.9及び6.0といずれも有意に低下した。個別評価項目については、大腿骨外側顆 (中間帯および深在帯細胞変化: 1.3 {対照群1} から0.3で有意に低下、サフラニンO染色性低下: 0.6 {対照群1} から0.0で有意に低下、構造変化・浅在帯細胞変化は低下傾向)、大腿骨内側顆 (構造変化: 4.3 {対照群1} から1.4で有意に低下、中間帯および深在帯細胞変化: 3.6 {対照群1} から1.4で有意に低下、サフラニンO染色性低下: 1.1 {対照群1} から0.6で有意に低下、浅在帯細胞変化は低下傾向)、脛骨外側顆 (浅在帯細胞変化: 1.4 {対照群1} から0.4で有意に低下、サフラニンO染色性低下: 0.7 {対照群1} から0.1で有意に低下) で評点の低下が認められた。

【0267】FK506投与群では大腿骨関節軟骨の内側顆で合計評点が7.9と有意に低下した。個別評価項目については、大腿骨外側顆 (中間帯および深在帯細胞変化: 1.3 {対照群1} から0.4で有意に低下、サフラニンO染色性低下: 0.6 {対照群1} から0.1で有意に低下)、大腿骨内側顆 (構造変化: 4.3 {対照群1} から2.3で有意に低下、中間帯および深在帯細胞変化・サフラニンO染色性低下は低下傾向)、脛骨外側顆 (中間帯および深在帯細胞変化: 1.1 {対照群1} から0.3で有意に低下、サフラニンO染色性低下: 0.7 {対照群1} から0.1で有意に低下、浅在帯細胞変化は低下傾向) で評点の低下が認められた。

【0268】対照群2では、大腿骨関節軟骨の外側顆及び内側顆で合計評点が5.6及び10.0、脛骨関節軟骨の外側顆及び内側顆で合計評点が5.9及び8.3の軟骨病変が認められた。これら変化を示した対照群2と比較しPhloretin塩投与群では合計評点に有意差は見られなかったものの、大腿骨外側顆における中間帯および深在帯細胞変化評点が1.0 (対照群2) から0.1 (Phloretin塩投与群) と有意に低下した。その他、大腿骨外側顆 (構造変化・浅在帯細胞変化)、脛骨外側顆 (構造変化・中間帯および深在帯細胞変化)、脛骨内側顆 (浅在帯細胞変化) の評点に低下の傾向が見られた。

【0269】以上の結果から、Glutamine synthase阻害剤であるL-Methionine sulfoximine、FK506-binding protein 1A阻害剤であるFK506、Aquaporin 1の阻害剤Phloretinは、いずれも関節軟骨病変抑制作用を有することが明らかとなった。

【0270】実施例9 炎症性メディエーターPGE2の産生に対するAquaporin 1阻害剤の効果の判定
炎症性メディエーターPGE2の産生に対するAquaporin 1阻害剤の効果測定した。

1) 実験方法

マウス胎児由来線維芽細胞株ATDC5は理研細胞銀行より入手し、5%牛胎児血清 (シグマ社) 含有のDMEM/F12培地 (シグマ社) にて培養した。

【0271】実験時には、フェノールレッド不含のトリプシンEDTAで細胞を剥離し、5%牛胎児血清含有のフェノールレッド不含DMEM/F12培地 (インビトロジェン社) にて細胞を96穴プレートにまき込んだ。細胞密度は 1×10^5 cells/mlとし、それぞれ1ウエルあたり100μlまき込んだ。24時間後、刺激剤であるマウスIL-1β (ペプロテック社: カタログ番号211-11B) を終濃度 (0.1ng/ml) の4倍濃度で50μl、Aquaporin 1の阻害剤であるPhloretin (シグマ、カタログ番号P7912) を終濃度 (25μM) の4倍濃度で50μl、それぞれ添加した。PhloretinはDMSOに溶解したため、溶媒としてDMSOを添加したウエルを設けて、比較対照とした。溶媒の濃度は0.1%とした。Phloretin添加24時間後、培養上清をサンプリングし、測定時まで-80℃で保存した。各2ウエルを設けたが、アッセイ時には両ウエルの培養上清を等量混合し1サンプルとして測定した。PGE2はCayman Chemical社EIAキットを用い、添付のプロトコールに従って測定した。

【0272】2) 結果

IL-1β刺激により、PGE2産生は2.7倍に上昇した。Phloretinの添加により、IL-1β刺激により誘導されたPGE2の産生は45%抑制された。このことから、Aquaporin 1阻害剤であるPhloretinには変形性関節症における炎症病態を抑制することが示された。

【0273】実施例10 Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbAβ遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-b

inding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子および／またはGlutamine synthase遺伝子発現制御剤のスクリーニング

マウスATDC5細胞(RIKEN Cell Bank; HYPERLINK [http://www.rtc.riken.go.jp/CELL/HTML/RIKEN Cell Bank. Htm](http://www.rtc.riken.go.jp/CELL/HTML/RIKEN%20Cell%20Bank.htm)から入手可能)を5%ウシ胎児血清ヒトトランスフェリン(終濃度10 μ g/ml)・3 \times 10⁸M セレン酸ナトリウム含有DMEM/F12培地を用い、37 $^{\circ}$ C、CO₂濃度5%の条件下で培養する。計数したATDC5細胞を1 \times 10⁴ cells/cm²でプレートに播種し、37 $^{\circ}$ C、CO₂濃度5%で培養する。当該細胞に対して、ウシインスリン(終濃度10 μ g/ml)と被験物質含有溶液(100 μ M、10 μ M、および1 μ Mの各濃度の被験物質を含む溶液)とを同時に添加するか、若しくはインスリンをあらかじめ添加して数日間培養した後に前記被験物質含有溶液を添加し、37 $^{\circ}$ C、CO₂濃度5%で3~21日間、もしくは37 $^{\circ}$ C、CO₂濃度5%で21日間培養した後37 $^{\circ}$ C、CO₂濃度3%で培養する。ここで、対照実験として、被験物質無添加の細胞についても同様の培養を行う(コントロール)。これらの各培養細胞より抽出したRNAを用いて実施例3に記載された方法で、Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子および／またはGlutamine synthase遺伝子の発現量を調べる。その発現量からコントロールと比べてAcetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝

$$\text{透過性(cm/sec)} = [(V40 - V20) / 20] / [(A20 \times 10^{-2} \times 4) \times 1.384]$$

【0276】式中、V20は、20秒後の卵母細胞の体積(cm³)を表し、V40は、40秒後の卵母細胞の体積(cm³)を表し、A20は、20秒後の卵母細胞の断面積(mm²)を表す。コントロールと比べてこの前記透過性が10%以上低下した被験物質を軟骨障害の緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

【0277】実施例12 Rev-ErbA β の機能(活性)制御剤のスクリーニング

配列番号: 3に記載のヒトRev-ErbA β cDNAを常法によりクローニングし、発現ベクターに組み込む。またROR α 1遺伝子(Genes Dev., 8, 538-553, 1994)発現ベクター、ROR応答性領域(5'-ATACTAGGTCA-3')をpGL3-promoter Vector(プロメガ社製)等のプロモーター領域を含むルシフェラーゼベクターに組み込んだレポーターベクターも調製する。

【0278】COS-7細胞(RIKEN Cell Bank; HYPERLINK [http://www.rtc.riken.go.jp/CELL/HTML/RIKEN Cell Bank. Htm](http://www.rtc.riken.go.jp/CELL/HTML/RIKEN%20Cell%20Bank.htm)から入手可能)に、前記ROR α 1遺伝子発現ベクター、Rev-ErbA β 遺伝子発現ベクター、およびレポーターベクターを導入して形質転換細胞を作製する。この細胞を96ウェル培養皿に1 \times 10⁴ cells/100 μ l/ウェル

子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acyl-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase 1遺伝子および／またはGlutamine synthase遺伝子の発現量が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上変動している培養系に添加した被験物質を、軟骨障害の緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

【0274】実施例11 Aquaporin 1の機能(活性)制御剤のスクリーニング

配列番号: 7に記載のヒトAquaporin 1 cDNAを常法によりT7発現ベクターpBluescriptSK(+) (STRATAGENE)にクローニングし、MEGAscript High Yield Transcription Kitを用い、付属のプロトコールに従いAquaporin 1 RNAを合成する。このヒトAquaporin 1 RNA(10ng)をアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすると共に、これを等張な培養液(約200mOsm)中、20 $^{\circ}$ Cで3日間培養する。ここで、100 μ M、10 μ Mおよび1 μ Mの濃度に調製した被験物質含有溶液を添加すると共に、対照実験として、被験物質無添加の細胞についても同様の培養を行う(コントロール)。次にこの培養卵母細胞を低張な培養液(約40mOsm)中へ移動する。移動20秒後及び40秒後に写真撮影を行い、画像解析装置を用いて卵母細胞の断面積及び体積を求める。膜タンパクの水透過性は、下記の式により算出する。

【0275】

【数4】

になるように播き込み、24時間培養を行う。各ウェルに100 μ M、10 μ Mおよび1 μ Mの濃度に調製した被験物質含有溶液を添加し、24時間培養を続ける。ここで、対照実験として、被験物質無添加の細胞についても同様の培養を行う(コントロール)。培養終了後、培養上清を吸引し、ルシフェラーゼの基質(プロメガ社製)を添加し、ルミノメーターML3000(Dynatech Laboratories)で10秒間の発光量を測定することでルシフェラーゼ活性を検出する。コントロールと比べてルシフェラーゼ活性が30%以上好ましくは50%以上変動している培養系に添加した被験物質を軟骨障害の緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

【0279】

【発明の効果】本発明によって、軟骨障害、例えば変形性関節症、軟骨形成異常症、変形性椎間板症、軟骨の欠損、軟骨損傷、半月板損傷、骨折の修復・治癒不全などの疾患、あるいは軟骨細胞移植時において発現が特異的に増大している遺伝子(Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1遺伝子、Rev-ErbA β 遺伝子、Selenoprotein P遺伝子、Aquaporin 1遺伝子、BMP-3b遺伝子、FK506-binding protein 1A遺伝子、Apolipoprotein E遺伝子、Acy

l-CoA synthetase 5遺伝子、Epoxide hydrolase1遺伝子およびGlutamine synthase遺伝子)が明らかになった。かかる遺伝子は軟骨障害の遺伝子診断に用いられるマーカー遺伝子(プローブ、プライマー)として有用である。該マーカー遺伝子の利用によれば、軟骨障害が検出でき、またその病因の究明および高精度の診断が可能であり、これらによりより適切な治療を施すことも可能となる。

【0280】また、上記遺伝子の発現と軟骨障害との関

連から、該遺伝子の発現を制御する化合物は、軟骨障害の治療薬として有用と考えられる。従って、この遺伝子の発現の変動、または当該遺伝子がコードするタンパク質の機能(活性)変動を指標とすることによって、軟骨障害の治療薬となり得る候補薬をスクリーニングし選別することが可能である。本発明は、このような軟骨障害治療薬の開発技術をも提供する。

【0281】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>; Sumitomo Pharmaceuticals

<120>; A marker of cartilage disorders and its use

<130>; 84002JP

<140>;

<141>;

<150>; JP 2001/367993

<151>; 2001-11-30

<160>; 20

<170>; PatentIn Ver. 2.1

<210>; 1

<211>; 1518

<212>; DNA

<213>; Homo sapiens

<400>; 1

```

aggccgctag ggtcgggggt tggggaggag gccgctagtc tacgcctgtg gagccgatac 60
tcagccctct gcgaccatgg ctgtgctggc ggcacttctg cgcagcggcg cccgcagccg 120
cagcccccctg ctccggaggc tggcgcagga aataagatat gtggaacgga gttatgtatc 180
aaaacccact ttgaaggaag tggcatagat aagtgtaca agaaccacca ttgatctttt 240
tttaggcagc ctttccttgc tgccagccac taagcttggg tccattgcaa ttcagggagc 300
cattgaaaag gcagggattc caaaagaaga agtgaaagaa gcatacatgg gtaatgttct 360
acaaggaggt gaaggacaag ctctacaag gcaggcagta ttgggtgcag gcttacctat 420
ttctactcca tgtaccacca taaacaaagt ttgtgttca ggaatgaaag ccatcatgat 480
ggcctctcaa agtcttatgt gtggacatca ggatgtgatg gtggcagtg gtagggagag 540
catgtccaat gttccatag taatgaacag aggatcaaca ccatatgggt gggtaaagct 600
tgaagatttg attgtaaaag acgggctaac tgatgtctac aataaaattc atatgggcag 660
ctgtgctgag aatacagcaa agaagtgaa tattgcacga aatgaacagg acgcttatgc 720
tattaattct tataaccagaa gtaaagcagc atgggaagct gggaaatttg gaaatgaagt 780
tattcctgtc acagttacag taaaaggtca accagatgta gtggtgaaag aagatgaaga 840
atataaacgt gttgatttta gcaaagtcc aaagctgaag acagtttcc agaaagaaaa 900
tggcacagta acagctgcca atgccagtac actgaatgat ggagcagctg ctctggttct 960
catgacggca gatgcagcga agaggctcaa tgttacacca ctggcaagaa tagtagcatt 1020
tgctgacgct gctgtagaac ctattgattt tccaattgct cctgtatatg ctgcacttat 1080
ggttctttaa gatgtgggat tgaaaaaaga agatattgca atgtgggaag taaatgaagc 1140
ctttagctg gttgtactag caaacattaa aatgttgag attgatcccc aaaagtga 1200
tatcaatgga ggagctgttt ctctgggaca tccaattggg atgtctggag ccaggattgt 1260
tggtcatttg actcatgcct tgaagcaagg agaatacggc cttgccagta tttgcaatgg 1320
aggaggaggt gcttctgcca tgctaattca gaagctgtag acaacctctg ctatttaagg 1380
agacaaccct atgtgaccag aaggcctgct gtaatcagtg tgactactgt gggtcagctt 1440
atattcagat aagctgtttc attttttatt attttctatg ttaactttta aaaatcaaaa 1500
tgatgaaatc ccaaaaca
1518

```


<210> 2

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ala Val Leu Ala Ala Leu Leu Arg Ser Gly Ala Arg Ser Arg Ser
  1           5           10          15
Pro Leu Leu Arg Arg Leu Val Gln Glu Ile Arg Tyr Val Glu Arg Ser
      20           25           30
Tyr Val Ser Lys Pro Thr Leu Lys Glu Val Val Ile Val Ser Ala Thr
      35           40           45
Arg Thr Pro Ile Gly Ser Phe Leu Gly Ser Leu Ser Leu Leu Pro Ala
      50           55           60
Thr Lys Leu Gly Ser Ile Ala Ile Gln Gly Ala Ile Glu Lys Ala Gly
      65           70           75           80
Ile Pro Lys Glu Glu Val Lys Glu Ala Tyr Met Gly Asn Val Leu Gln
      85           90           95
Gly Gly Glu Gly Gln Ala Pro Thr Arg Gln Ala Val Leu Gly Ala Gly
      100          105          110
Leu Pro Ile Ser Thr Pro Cys Thr Thr Ile Asn Lys Val Cys Ala Ser
      115          120          125
Gly Met Lys Ala Ile Met Met Ala Ser Gln Ser Leu Met Cys Gly His
      130          135          140
Gln Asp Val Met Val Ala Gly Gly Met Glu Ser Met Ser Asn Val Pro
      145          150          155          160
Tyr Val Met Asn Arg Gly Ser Thr Pro Tyr Gly Gly Val Lys Leu Glu
      165          170          175
Asp Leu Ile Val Lys Asp Gly Leu Thr Asp Val Tyr Asn Lys Ile His
      180          185          190
Met Gly Ser Cys Ala Glu Asn Thr Ala Lys Lys Leu Asn Ile Ala Arg
      195          200          205
Asn Glu Gln Asp Ala Tyr Ala Ile Asn Ser Tyr Thr Arg Ser Lys Ala
      210          215          220
Ala Trp Glu Ala Gly Lys Phe Gly Asn Glu Val Ile Pro Val Thr Val
      225          230          235          240
Thr Val Lys Gly Gln Pro Asp Val Val Val Lys Glu Asp Glu Glu Tyr
      245          250          255
Lys Arg Val Asp Phe Ser Lys Val Pro Lys Leu Lys Thr Val Phe Gln
      260          265          270
Lys Glu Asn Gly Thr Val Thr Ala Ala Asn Ala Ser Thr Leu Asn Asp
      275          280          285
Gly Ala Ala Ala Leu Val Leu Met Thr Ala Asp Ala Ala Lys Arg Leu
      290          295          300
Asn Val Thr Pro Leu Ala Arg Ile Val Ala Phe Ala Asp Ala Ala Val
      305          310          315          320
Glu Pro Ile Asp Phe Pro Ile Ala Pro Val Tyr Ala Ala Ser Met Val
      325          330          335
Leu Lys Asp Val Gly Leu Lys Lys Glu Asp Ile Ala Met Trp Glu Val
      340          345          350
Asn Glu Ala Phe Ser Leu Val Val Leu Ala Asn Ile Lys Met Leu Glu

```

355	360	365
Ile Asp Pro Gln Lys Val	Asn Ile Asn Gly Gly	Ala Val Ser Leu Gly
370	375	380
His Pro Ile Gly Met Ser	Gly Ala Arg Ile Val	Gly His Leu Thr His
385	390	395
Ala Leu Lys Gln Gly Glu Tyr	Gly Leu Ala Ser	Ile Cys Asn Gly Gly
405	410	415
Gly Gly Ala Ser Ala Met	Leu Ile Gln Lys Leu	
420	425	

<;210>; 3

<;211>; 2147

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 3

```

gctgccctcc ccgtcagccg ccctcgccgc cgcggtgcgc tggctgcagg aagccgccgc 60
gccgccgttt ttgttgcag ggacccagcg aggagcgccg ctgccggcc gccgccaccc 120
tctctcgtg cagcctgctg tgcgtgcac ggctggggc cgggcgccc ccgcgtctgc 180
ccatgagggg gccccgcgac caccgtgct tccagcccgg ggcggcgccg cgtgaggcg 240
gcggcgccgg cgccctgccc cctctcggg aagcggcgcc cccggccgc ctccgcgagg 300
gcacatgga ggtgaatgca ggaggtgta ttgcctatat cagttcttcc agctcagcct 360
caagccctgc ctcttgcac agtgagggtt ctgagaatag tttccagtcc tctcctctt 420
ctgttccatc ttctccaaat agctctaatt ctgataccaa tggtaatccc aagaatggtg 480
atctcgccaa tatgaaaggc atcttgaaga atgacgaat agattgttct atgaaaacaa 540
gcaaatcgag tgcacctggg atgacaaaaa gtcatagtgg tgtgacaaaa ttagtgga 600
tggttctact gtgtaaagtc tgtgggatg tggcgtcagg attccactat ggagttcatg 660
cttgcaagg ctgtaagggt ttctttcgga gaagtattca aaaaacatc cagtacaaga 720
agtgcctgaa gaatgaaaac tgttctataa tgagaatgaa taggaacaga tgcagcaat 780
gtcgcttcaa aaagtgtctg tctgttgaa tgtcaagaga tgcgttcgg tttggtcgta 840
ttcctaagcg tgaaaaacag aggatgctaa ttgaaatgca aagtgaatg aagaccatga 900
tgaacagcca gttcagtggt cacttgcaaa atgacacatt agtagaacat catgaacaga 960
cagccttgcc agcccaggaa cagctgcgac ccaagcccca actggagcaa gaaaacatca 1020
aaagctcttc tctccatct tctgattttg caaaggaaga agtgattggc atggtgacca 1080
gagtcacaa ggataccttt atgtataatc aagagcagca agaaaactca gctgagagca 1140
tgcagcccca gagaggagaa cggattccca agaacatgga gcaatataat ttaaatcatg 1200
atcattgcgg caatgggctt agcagccatt ttccctgtag tgagagccag cagcatctca 1260
atggacagtt caaaggagg aatataatgc attacccaaa tggatgcc atttgattg 1320
caaatggaca ttgatgaac ttctcaatg cttatactca aagagtatgt gatagagttc 1380
cgatagatgg attttctcag aatgagaaca agaatagtta cctgtgcaac actggaggaa 1440
gaatgcatct ggtttgtcca atgagtaagt ctccatatgt ggatcctcat aaatcaggac 1500
atgaaatctg ggaagaattt tcgatgagct tcaactccagc agtgaagaa gtggtggaat 1560
ttgcaaagcg tattctggg ttacagatc tctctcagca tgaccaggtc aaccttttaa 1620
aggctgggac ttttgaggtt ttaatggtag ggttcgcatc attattgat gcaaaggaa 1680
gtactgtcac ctttttaagt ggaagaaat atagtgtgga tgatttacac tcaatgggag 1740
caggggatct gctaaactct atgtttgaat ttagtgagaa gctaaatgcc ctccaactta 1800
gtgatgaaga gatgagttt tttacagctg ttgtcttgt atctgcagat cgatctggaa 1860
tagaaaacgt caactctgtg gagctttgc aggaaactct cattcgtgca ctaaggacct 1920
taataatgaa aaaccatcca aatgagcct ctatitttac aaaactgctt ctaaagttgc 1980
cagatcttcg atctttaaac aacatgcact ctgaggagct cttggccttt aaagttcacc 2040
cttaaggcct ttgtttatit aaacatgaac tgatgtgtaac tgtacatttt gtgctaaaat 2100
gcataattat atgtgcatac catatgtgga gatagaaaag accttta 2147

```

<;210>; 4

<;211>; 579

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 4

Met	Glu	Val	Asn	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser
1				5					10					15	
Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Ala	Ser	Cys	His	Ser	Glu	Gly	Ser	Glu	Asn	Ser
			20				25						30		
Phe	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Ser	Asn
			35				40					45			
Ser	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	Pro	Lys	Asn	Gly	Asp	Leu	Ala	Asn	Ile	Glu
			50				55					60			
Gly	Ile	Leu	Lys	Asn	Asp	Arg	Ile	Asp	Cys	Ser	Met	Lys	Thr	Ser	Lys
65				70						75				80	
Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Met	Thr	Lys	Ser	His	Ser	Gly	Val	Thr	Lys	Phe
				85					90					95	
Ser	Gly	Met	Val	Leu	Leu	Cys	Lys	Val	Cys	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Gly
			100					105					110		
Phe	His	Tyr	Gly	Val	His	Ala	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly	Phe	Phe	Arg
			115					120					125		
Arg	Ser	Ile	Gln	Gln	Asn	Ile	Gln	Tyr	Lys	Lys	Cys	Leu	Lys	Asn	Glu
			130				135					140			
Asn	Cys	Ser	Ile	Met	Arg	Met	Asn	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln	Gln	Cys	Arg
145					150					155				160	
Phe	Lys	Lys	Cys	Leu	Ser	Val	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Ala	Val	Arg	Phe
			165							170				175	
Gly	Arg	Ile	Pro	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Arg	Met	Leu	Ile	Glu	Met	Gln
			180					185					190		
Ser	Ala	Met	Lys	Thr	Met	Met	Asn	Ser	Gln	Phe	Ser	Gly	His	Leu	Gln
			195				200					205			
Asn	Asp	Thr	Leu	Val	Glu	His	His	Glu	Gln	Thr	Ala	Leu	Pro	Ala	Gln
			210				215					220			
Glu	Gln	Leu	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Leu	Glu	Gln	Glu	Asn	Ile	Lys	Ser
225				230						235				240	
Ser	Ser	Pro	Pro	Ser	Ser	Asp	Phe	Ala	Lys	Glu	Glu	Val	Ile	Gly	Met
			245						250					255	
Val	Thr	Arg	Ala	His	Lys	Asp	Thr	Phe	Met	Tyr	Asn	Gln	Glu	Gln	Gln
			260					265					270		
Glu	Asn	Ser	Ala	Glu	Ser	Met	Gln	Pro	Gln	Arg	Gly	Glu	Arg	Ile	Pro
			275				280					285			
Lys	Asn	Met	Glu	Gln	Tyr	Asn	Leu	Asn	His	Asp	His	Cys	Gly	Asn	Gly
			290				295					300			
Leu	Ser	Ser	His	Phe	Pro	Cys	Ser	Glu	Ser	Gln	Gln	His	Leu	Asn	Gly
305				310						315				320	
Gln	Phe	Lys	Gly	Arg	Asn	Ile	Met	His	Tyr	Pro	Asn	Gly	His	Ala	Ile
			325						330					335	
Cys	Ile	Ala	Asn	Gly	His	Cys	Met	Asn	Phe	Ser	Asn	Ala	Tyr	Thr	Gln
			340					345					350		

Arg Val Cys Asp Arg Val Pro Ile Asp Gly Phe Ser Gln Asn Glu Asn
 355 360 365
 Lys Asn Ser Tyr Leu Cys Asn Thr Gly Gly Arg Met His Leu Val Cys
 370 375 380
 Pro Met Ser Lys Ser Pro Tyr Val Asp Pro His Lys Ser Gly His Glu
 385 390 395 400
 Ile Trp Glu Glu Phe Ser Met Ser Phe Thr Pro Ala Val Lys Glu Val
 405 410 415
 Val Glu Phe Ala Lys Arg Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Ser Gln His
 420 425 430
 Asp Gln Val Asn Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val Leu Met Val
 435 440 445
 Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asp Ala Lys Glu Arg Thr Val Thr Phe Leu
 450 455 460
 Ser Gly Lys Lys Tyr Ser Val Asp Asp Leu His Ser Met Gly Ala Gly
 465 470 475 480
 Asp Leu Leu Asn Ser Met Phe Glu Phe Ser Glu Lys Leu Asn Ala Leu
 485 490 495
 Gln Leu Ser Asp Glu Glu Met Ser Leu Phe Thr Ala Val Val Leu Val
 500 505 510
 Ser Ala Asp Arg Ser Gly Ile Glu Asn Val Asn Ser Val Glu Ala Leu
 515 520 525
 Gln Glu Thr Leu Ile Arg Ala Leu Arg Thr Leu Ile Met Lys Asn His
 530 535 540
 Pro Asn Glu Ala Ser Ile Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys Leu Pro Asp
 545 550 555 560
 Leu Arg Ser Leu Asn Asn Met His Ser Glu Glu Leu Leu Ala Phe Lys
 565 570 575

Val His Pro

<;210>; 5

<;211>; 2038

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 5

gcaggcccggt tggagtggt tgtgacaacc ccagcaatgt ggagaagcct ggggcttgcc 60
 ctggetctct gtctctccc atcgaggga acagagagcc aggaccaaag ctcttatgt 120
 aagcaacccc cagcctggag cataagagat caagatccaa tgctaaactc caatggttca 180
 gtgactgtgg ttgctcttct tcaagccagc tgatacctgt gcatcatcga ggcactctaa 240
 ttagaagacc tgcgagtaaa actgaagaaa gaaggatatt ctaatatctc ttatattgtt 300
 gttaatcatc aaggaatctc ttctcgatta aaatacacac atcttaagaa taagggttca 360
 gagcatattc ctgtttatca acaagaagaa aaccaaacag atgtctggac tcttttaaat 420
 ggaagcaaag atgacttcct catatatgat agatgtggcc gtcttgata tcatcttggt 480
 ttgccttttt cttcctaac ttcccatat gtagaagaag ccattaagat tgettactgt 540
 gaaagaaat gtgaaactg ctctctcag actctcaaag atgaagactt ttgtaaacgt 600
 gtatctttgg ctactgtgga taaacagtt gaaactccat cgcctcatta ccatcatgag 660
 catcatcaca atcatggaca tcagcacctt ggcagcagtg agctttcaga gaatcagcaa 720
 ccaggagcac caaatgctcc tactcactct gctctccag gccttcatca ccaccataag 780
 cacaagggtc agcataggca gggtcaccca gagaaccgag atatgccagc aagtgaagat 840
 ttacaagatt taaaaagaa gctctgtcga aagagatgta taaatcaatt actctgtaaa 900
 ttgccacag attcagagtt ggctcctagg agctgatgct gccattgtcg acatctgata 960

```

tttgaaaaa cagggtctgc aatcacctga cagtgtaaag aaaacctccc atctttatgt 1020
agctgacagg gacttcgggc agaggagaac ataactgaat cttgtcagtg acgtttgcct 1080
ccagctgcct gacaaataag tcagcagctt ataccacag aagccagtg cagttgacgc 1140
tgaagaatc aggcaaaaa gtgagaatga ccttcaaact aaatatttaa aataggacat 1200
actccccaat ttagtctaga cacaatttca ttccagcat tttataaac taccaaatta 1260
gtgaacaaa aatagaaatt agatttgtgc aaacatggag aaatctactg aattggcttc 1320
cagattttta attttatgtc atagaaatat tgactcaaac catatTTTTT atgatggagc 1380
aactgaaagg tgattgcagc ttttggttaa tatgtctttt ttttctttt tccagtgttc 1440
tatttgcttt aatgagaata gaaacgtaaa ctatgacctt ggggttttct gttggataat 1500
tagcagttta gaatggagga agaacaacaa agacatgctt tccatTTTTT cctttactta 1560
tctctcaaaa caatattact ttgtcttttc aatcttctac ttttaactaa taaaataagt 1620
ggattttgta ttttaagatc cagaaatact taacacgtga atattttgct aaaaaagcat 1680
atataactat tttaaatate catttatctt ttgtatatct aagactcatc ctgattttta 1740
ctatcacaca tgaataaagg cctttgtatc tttctttctc taatgttgta tcatactctt 1800
ctaaaacttg agtggctgtc ttaaaagata taaggggaaa gataatattg tctgtctcta 1860
tattgcttag taagtatttc catagtcaat gatggtttta taggtaaacc aaacctata 1920
aacctgacct cctttatggt taatactatt aagcaagaat gcagtacaga attggatata 1980
gtacggattt gtccaaataa attcaataaa aaccttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2038
<;210>; 6

```

<;211>; 381

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 6

```

Met Trp Arg Ser Leu Gly Leu Ala Leu Ala Leu Cys Leu Leu Pro Ser
  1             5             10            15
Gly Gly Thr Glu Ser Gln Asp Gln Ser Ser Leu Cys Lys Gln Pro Pro
             20             25            30
Ala Trp Ser Ile Arg Asp Gln Asp Pro Met Leu Asn Ser Asn Gly Ser
             35             40            45
Val Thr Val Val Ala Leu Leu Gln Ala Ser Xaa Tyr Leu Cys Ile Ile
             50             55            60
Glu Ala Ser Lys Leu Glu Asp Leu Arg Val Lys Leu Lys Lys Glu Gly
             65             70            75            80
Tyr Ser Asn Ile Ser Tyr Ile Val Val Asn His Gln Gly Ile Ser Ser
             85             90            95
Arg Leu Lys Tyr Thr His Leu Lys Asn Lys Val Ser Glu His Ile Pro
             100            105            110
Val Tyr Gln Gln Glu Glu Asn Gln Thr Asp Val Trp Thr Leu Leu Asn
             115            120            125
Gly Ser Lys Asp Asp Phe Leu Ile Tyr Asp Arg Cys Gly Arg Leu Val
             130            135            140
Tyr His Leu Gly Leu Pro Phe Ser Phe Leu Thr Phe Pro Tyr Val Glu
             145            150            155            160
Glu Ala Ile Lys Ile Ala Tyr Cys Glu Lys Lys Cys Gly Asn Cys Ser
             165            170            175
Leu Thr Thr Leu Lys Asp Glu Asp Phe Cys Lys Arg Val Ser Leu Ala
             180            185            190
Thr Val Asp Lys Thr Val Glu Thr Pro Ser Pro His Tyr His His Glu
             195            200            205
His His His Asn His Gly His Gln His Leu Gly Ser Ser Glu Leu Ser

```

210	215	220
Glu Asn Gln Gln Pro Gly	Ala Pro Asn Ala Pro	Thr His Pro Ala Pro
225	230	235
Pro Gly Leu His His His	Lys His Lys Gly Gln	His Arg Gln Gly
245	250	255
His Pro Glu Asn Arg Asp	Met Pro Ala Ser Glu	Asp Leu Gln Asp Leu
260	265	270
Gln Lys Lys Leu Cys Arg	Lys Arg Cys Ile Asn	Gln Leu Leu Cys Lys
275	280	285
Leu Pro Thr Asp Ser Glu	Leu Ala Pro Arg Ser	Xaa Cys Cys His Cys
290	295	300
Arg His Leu Ile Phe Glu	Lys Thr Gly Ser Ala	Ile Thr Xaa Gln Cys
305	310	315
Lys Glu Asn Leu Pro Ser	Leu Cys Ser Xaa Gln	Gly Leu Arg Ala Glu
325	330	335
Glu Asn Ile Thr Glu Ser	Cys Gln Xaa Arg Leu	Pro Pro Ala Ala Xaa
340	345	350
Gln Ile Ser Gln Gln Leu	Ile Pro Thr Glu Ala	Ser Ala Ser Xaa Arg
355	360	365
Xaa Lys Asn Gln Ala Lys	Lys Xaa Glu Xaa Pro	Ser Asn
370	375	380

<;210>; 7

<;211>; 1662

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 7

```

gcaccggca gcggtctcag gccaaagccc ctgccagcat ggccagcgag ttcaagaaga 60
agetcttctg gagggcagtg gtggccagat tcttgccac gacctcttt gtcttcac 120
gcacgggttc tgccttgagg ttcaaatacc cgggtgggaa caaccagacg gcggtccagg 180
acaacgtgaa ggtgtcgtg gccttcgggc tgagcatcgc cacgtggcg cagagtgtgg 240
gccacatcag cggcgccac ctcaaccgg ctgtcacact ggggtgctg ctacagtgcc 300
agatcagcat ctccgtgcc ctcatgtaca tcacgcccc gtgcgtgggg gccatcgtcg 360
ccaccgcat cctctcaggc atcacctcct cctgactgg gaactcgtt ggccgcaatg 420
acctggctga tgggtgaac tggggcagg gcctggcat cgagatcac gggacctcc 480
agctgggtct atgcgtgctg gtactaccg accggaggcg cctgacatt ggtggtcag 540
cccccttgc catcgccctc tctgtagccc ttggacacct cctggtatt gactacactg 600
gtgtgtggat taacctgct cggtccttg gtccgcggt gatcacacac aacttcagca 660
accactggat ttcttggtg gggccattca tcgggggagc cctggtgta ctcatctacg 720
acttcacct gggccacgc agcagtgacc tcacagaccg cgtgaagggtg tggaccagcg 780
gccagggtga ggagtatgac ctggatgccg acgacatcaa ctccagggtg gagatgaagc 840
ccaaatagaa ggggtctggc cgggcatcc acgtaggggg caggggcagg ggcggcgga 900
gggaggggag ggtgaaatc catactgtag aactctgac aagctggcca aagtcacttc 960
cccaagatct gccagacctg catggtcaag cctcttatgg ggtgtttct atctctttct 1020
ttctctttct gtttctggc ctacagagctt cctggggacc aagatttacc aattcaccca 1080
ctcccttgaa gttgtggagg agtgaaaga aaggaccca cctgctagtc gccctcaga 1140
gcatgatggg aggtgtgcca gaaagtcccc cctcgcccca aagttgctca ccgactcacc 1200
tgcgaagtg cctgggattc taccgtaatt gctttgtgcc tttgggcagg cctccttct 1260
tttcctaaca tgcaccttgc tccaatggt gcttgaggg ggaagagatc ccaggaggtg 1320
cagtggaggg ggcaagcttt gctccttcag ttctgcttgc tccaagccc ctgacctgct 1380

```


cggacttact gcctgacctt ggaatcgccc ctatatcagg gcctgagtga cctccttctg 1440
 caaagtggca gggaccggca gagctctaca ggctgcagc ccctaagtgc aaacacagca 1500
 tgggtccaga agacgtggtc tagaccaggg ctgctctttc cacttgccct gtgttctttc 1560
 cccaggggca tgactgtcgc cacacgctc tgcataatg tctctttgga gttggaattt 1620
 cattatatgt taagaaaata aaggaaatg acttgtaagg tc 1662

<;210>; 8

<;211>; 269

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 8

Met	Ala	Ser	Glu	Phe	Lys	Lys	Lys	Leu	Phe	Trp	Arg	Ala	Val	Val	Ala
1				5				10					15		
Glu	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Leu	Phe	Val	Phe	Ile	Ser	Ile	Gly	Ser	Ala
			20					25					30		
Leu	Gly	Phe	Lys	Tyr	Pro	Val	Gly	Asn	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Gln	Asp
			35					40					45		
Asn	Val	Lys	Val	Ser	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Ser	Ile	Ala	Thr	Leu	Ala
			50					55					60		
Gln	Ser	Val	Gly	His	Ile	Ser	Gly	Ala	His	Leu	Asn	Pro	Ala	Val	Thr
			65					70					75		80
Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Ser	Cys	Gln	Ile	Ser	Ile	Phe	Arg	Ala	Leu	Met
							85					90			95
Tyr	Ile	Ile	Ala	Gln	Cys	Val	Gly	Ala	Ile	Val	Ala	Thr	Ala	Ile	Leu
			100					105					110		
Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Gly	Asn	Ser	Leu	Gly	Arg	Asn	Asp
			115					120					125		
Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Asn	Ser	Gly	Gln	Gly	Leu	Gly	Ile	Glu	Ile	Ile
			130					135					140		
Gly	Thr	Leu	Gln	Leu	Val	Leu	Cys	Val	Leu	Ala	Thr	Thr	Asp	Arg	Arg
			145					150					155		160
Arg	Arg	Asp	Leu	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Leu	Ala	Ile	Gly	Leu	Ser	Val
							165						170		175
Ala	Leu	Gly	His	Leu	Leu	Ala	Ile	Asp	Tyr	Thr	Gly	Cys	Gly	Ile	Asn
			180					185					190		
Pro	Ala	Arg	Ser	Phe	Gly	Ser	Ala	Val	Ile	Thr	His	Asn	Phe	Ser	Asn
			195					200					205		
His	Trp	Ile	Phe	Trp	Val	Gly	Pro	Phe	Ile	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Val
			210					215					220		
Leu	Ile	Tyr	Asp	Phe	Ile	Leu	Ala	Pro	Arg	Ser	Ser	Asp	Leu	Thr	Asp
			225					230					235		240
Arg	Val	Lys	Val	Trp	Thr	Ser	Gly	Gln	Val	Glu	Glu	Tyr	Asp	Leu	Asp
								245					250		255
Ala	Asp	Asp	Ile	Asn	Ser	Arg	Val	Glu	Met	Lys	Pro	Lys			
							260						265		

<;210>; 9

<;211>; 2674

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 9

cacacacggg cgcacgcaca cggcagccgg gccagggaag accctgtcag ctgcagcccc 60

```

agaggctcgg ggcgcgcagc cgggtccctt cgaggcgca gccggccgcc cgcgccgcc 120
cctcgaagca gccgggccgg gcgcgcagtg ggctacaaac ttctgcagcg cgagtccgcc 180
aaggcagcgc gccgactcgg gctcggctcg gctctgcgt gctccggacg gctgtgaccg 240
ctggccgggg gctcgggccg ccggtaccca cggaccgcgc gcccggtgc ctgctccgct 300
aagccctcgg cccgcgcgg acctcggtat ccagcgccct gctccccggg ctctccccgc 360
gcgcctact gccgcgaggt cagtccgcag cctccggtgc gccagcgtc gcttctctcc 420
tcctggactt cggccctttg ccgcctcac cagccatgg ctcatgtccc cgctcggacc 480
agcccgggac ccggcccca gctgctgctg ctgctgctgc cgttgtttct gctgttctc 540
cgggatgtgg ccggcagcca caggccccc gccgtgtccg cactgccgc gcccgccgac 600
ggcctgcagg gggacagga tctccagcgg caccctgggg acgcggccgc caggttgagg 660
cccagcggc aggacatggt cgtgtccac atgcacaggc tctatgagaa gtacagccgg 720
caggcgcgcg gccgggagg gggcaacacg gtccgcagct tcagggccag gctggaagt 780
gtcgaccaga agccgtgta tttcttcaac ctgacttcca tgcaagactc ggaaatgatc 840
cttacggcca ctttccactt ctactcagag ccgctcggg gccctcagc gctcagggtg 900
ctatgcaagc cgcgggcca gaacgttca gccgcggcg tgccttggg cccgccaca 960
cgccagcacc tgccttccg cagcctctcg cagaacacgg ccacacaggg gctactccgc 1020
ggggccatgg ccttggcgc ccaccgcgc gccctgtggc agccaagga catctcccc 1080
atcgtcaagg cgcgcccg ggaaggcgag ctgctcctct ccgccagct ggattctgag 1140
gagagggacc cgggggtgcc ccggcccagc cctatgcgc cctacatcct agtctatgcc 1200
aacgatctgg ccactcggga gcccaacagc gtggcagtga cgctgcagag atacgacccc 1260
ttcctgcgg gagacccga gcccgcgca gccccaaca actcagcga ccccgcggtg 1320
cgccagccg cgcagccac tggcccctc caggacaacg agctgccgg gctggtgag 1380
aggccggcg gcgccacgc acagccttc cacaagcacc agctgtggc cagcccttc 1440
cggcgctga aacccggcc agggcgaaa gaccgcagga agaaggcca ggaggtgtc 1500
atggccgct cgcaggtgct ggactttgac gagaagacga tgcagaaagc ccggagggaag 1560
cagtgggatg agccgagggt gtgctccgg aggtacctga aggtggactt cgcagacatc 1620
ggctggaatg aatggataat ctaccgaaa tctttgatg cctactactg cgcgggagca 1680
tgtagttcc ccatgcctaa gatcgctgt ccatccaacc atgccaccat ccagagcatt 1740
gtcagggtg tggcatcat cctggcatc ccagagccct gctgtgttc cgataagatg 1800
aactccctg ggtcctctt cctggatgag aatcggaatg tggttctgaa ggtgtacccc 1860
aacatgtcgg tggacacctg tgctgcgg tgagaccact ccagggtgga aagaagccac 1920
gccagcaga gctgccttct cggagccttc tgcaaccagg acttgtgtg cagctgcaga 1980
cacagacac agtcatggg caacatcact ggggccaga gagagctgc gccagtgca 2040
tcattaggg gtctttcatt gctagtact agcccttaa atgccagcct gactacctga 2100
aggaatctgg gaattagccc tggcctgaaa gtggccatc attcataccc actgttctga 2160
aggcttgaac aaaaacata tcacaacat tggcttgatg tgatcatcat ctcataactg 2220
agcaagaaga ctatgcaaat cttaggcgcg tcgtccctg cacacggaaa gaactctgtt 2280
taaatgctca gttcagaaca cttgggcca catagtatt ttggaaaaca ggataatcgt 2340
ggtgtaaatg agtgttctt ttcaaagtc actgcagagc tttatccat atggtatgca 2400
catgtagcca atattggtt cttttctta atatatatat tttattttaa aacaacaaaa 2460
agggagggcg ttgacacct tccccaga gatagtcatg ctgagtgtgg gttgtttaaa 2520
catgcatatt gaaataacac atatagtaac gtgggaatac taaaaataa ccaagatttt 2580
atattttgt aaattatact ttctatactg tagattgtgt atgttatgtg tttttatgga 2640
aagctaataa attaaaggta cagtgtatc ttga 2674

```

<;210>; 10

<;211>; 478

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 10

Met Ala His Val Pro Ala Arg Thr Ser Pro Gly Pro Gly Pro Gln Leu

1	5	10	15
Leu Leu Leu Leu Leu Pro	Leu Phe Leu Leu Leu Leu Arg	Asp Val Ala	
20	25	30	
Gly Ser His Arg Ala Pro	Ala Trp Ser Ala Leu Pro	Ala Ala Ala Asp	
35	40	45	
Gly Leu Gln Gly Asp Arg	Asp Leu Gln Arg His Pro	Gly Asp Ala Ala	
50	55	60	
Ala Thr Leu Gly Pro Ser	Ala Gln Asp Met Val Ala Val	His Met His	
65	70	75	80
Arg Leu Tyr Glu Lys Tyr	Ser Arg Gln Gly Ala Arg	Pro Gly Gly Gly	
85	90	95	
Asn Thr Val Arg Ser Phe	Arg Ala Arg Leu Glu Val Val	Asp Gln Lys	
100	105	110	
Ala Val Tyr Phe Phe Asn	Leu Thr Ser Met Gln Asp	Ser Glu Met Ile	
115	120	125	
Leu Thr Ala Thr Phe His	Phe Tyr Ser Glu Pro Pro	Arg Trp Pro Arg	
130	135	140	
Ala Leu Glu Val Leu Cys	Lys Pro Arg Ala Lys Asn	Ala Ser Gly Arg	
145	150	155	160
Pro Leu Pro Leu Gly Pro	Pro Thr Arg Gln His Leu	Leu Phe Arg Ser	
165	170	175	
Leu Ser Gln Asn Thr Ala	Thr Gln Gly Leu Leu Arg	Gly Ala Met Ala	
180	185	190	
Leu Ala Pro Pro Pro Arg	Gly Leu Trp Gln Ala Lys	Asp Ile Ser Pro	
195	200	205	
Ile Val Lys Ala Ala Arg	Arg Asp Gly Glu Leu Leu	Leu Ser Ala Gln	
210	215	220	
Leu Asp Ser Glu Glu Arg	Asp Pro Gly Val Pro Arg	Pro Ser Pro Tyr	
225	230	235	240
Ala Pro Tyr Ile Leu Val	Tyr Ala Asn Asp Leu Ala	Ile Ser Glu Pro	
245	250	255	
Asn Ser Val Ala Val Thr	Leu Gln Arg Tyr Asp Pro	Phe Pro Ala Gly	
260	265	270	
Asp Pro Glu Pro Arg Ala	Ala Pro Asn Asn Ser Ala	Asp Pro Arg Val	
275	280	285	
Arg Arg Ala Ala Gln Ala	Thr Gly Pro Leu Gln Asp	Asn Glu Leu Pro	
290	295	300	
Gly Leu Asp Glu Arg Pro	Pro Arg Ala His Ala Gln	His Phe His Lys	
305	310	315	320
His Gln Leu Trp Pro Ser	Pro Phe Arg Ala Leu Lys	Pro Arg Pro Gly	
325	330	335	
Arg Lys Asp Arg Arg Lys	Lys Gly Gln Glu Val Phe	Met Ala Ala Ser	
340	345	350	
Gln Val Leu Asp Phe Asp	Glu Lys Thr Met Gln Lys	Ala Arg Arg Lys	
355	360	365	
Gln Trp Asp Glu Pro Arg	Val Cys Ser Arg Arg Tyr	Leu Lys Val Asp	
370	375	380	
Phe Ala Asp Ile Gly Trp	Asn Glu Trp Ile Ile Ser	Pro Lys Ser Phe	
385	390	395	400
Asp Ala Tyr Tyr Cys Ala	Gly Ala Cys Glu Phe Pro	Met Pro Lys Ile	

405 410 415
 Val Arg Pro Ser Asn His Ala Thr Ile Gln Ser Ile Val Arg Ala Val
 420 425 430
 Gly Ile Ile Pro Gly Ile Pro Glu Pro Cys Cys Val Pro Asp Lys Met
 435 440 445
 Asn Ser Leu Gly Val Leu Phe Leu Asp Glu Asn Arg Asn Val Val Leu
 450 455 460
 Lys Val Tyr Pro Asn Met Ser Val Asp Thr Cys Ala Cys Arg
 465 470 475
 <;210>; 11
 <;211>; 1532
 <;212>; DNA
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 11
 gaattcgggc cgccgccagg tcgtgttgg tccacgccgc ccgtcgccgc gcccgccgc 60
 tcacgctccg ccgccccat gggagtgcag gtgaaacca tctccccagg agacgggcgc 120
 acctccccca agcgcggcca gacctgcgtg gtgcactaca ccgggatgct tgaagatgga 180
 aagaaatttg attctcccg ggacagaaac aagcccttta agtttatgct aggcaagcag 240
 gaggtgatcc gaggtggga agaaggggtt gccagatga gtgtgggtca gagagccaaa 300
 ctgactatat ctccagatta tgcctatggt gccactgggc acccaggcat catccacca 360
 catgccactc tcgtcttga tgtggagctt ctaaaactgg aatgacagga atggcctcct 420
 cccttagctc cctgttcttg gatctgcat ggaggatct ggtgctcca gacatgtgca 480
 catgagtcca tatggagctt ttctgatgt tccactccac ttgtataga catctgcct 540
 gactgaatgt gttctgtcac tcagcttgc ttccgacacc tctgttctct ctccccctt 600
 ctctctgtat gtgtgtttac ctaaactata tgccataaac ctcaagttat tcattttatt 660
 ttgttttcat ttgggggtga agattcagtt tcagtctttt ggatataggt ttccaattaa 720
 gtacatggtc aagtattaac agcacaagtg gtaggttaac attagaatag gaattggtgt 780
 tggggggggg gtttgcaaga atattttatt ttaatttttt ggatgaaatt ttatctatt 840
 atatatataa cattcttgc gctgcctgc aaagccatag cagatttgag gcgtgttga 900
 ggactgaatt actctccaag ttgagagatg tctttgggtt aaattaaaag cctaccta 960
 aactgaggtg gggatgggga gagccttgc ctccaccatt ccacccacc ctccccctaa 1020
 accctctgcc ttgaaagta gatcatgttc actgcaatgc tggacactac aggtatctgt 1080
 ccctgggcca gcaggacct ctgaagcctt ctttgtggcc tttttttt ttcatctgt 1140
 ggttttteta atggacttcc aggaattttg taatctcata actttccaag ctccaccact 1200
 tctaaatct taagaacttt aattgacagt ttcaattgaa ggtgctgttt gtagacttaa 1260
 caccagtgaa aagccagcc atcatgaaa atccttgaat gttctcttaa gaaatgatg 1320
 ctggtcatcg cagcttcagc atctctgtt ttigtatgt tgctccctc tctgatctc 1380
 agtttctggt ctttctctcc ctacgccct tctacccct ttgctgtcct gtgtagtgt 1440
 ttggtgagaa atcgttctg caccctccc ccagcccat ttatgagtct caagttttat 1500
 tattgcaata aaagtgttt atgcccgaat tc 1532
 <;210>; 12
 <;211>; 108
 <;212>; PRT
 <;213>; Homo sapiens
 <;400>; 12
 Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe
 1 5 10 15
 Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu
 20 25 30
 Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys

35 40 45
 Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val
 50 55 60
 Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp
 65 70 75 80
 Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala
 85 90 95
 Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu
 100 105

<;210>; 13

<;211>; 1156

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 13

cgcagcggag gtgaaggacg tccttcccga ggagccgact ggccaatcac aggcaggaag 60
 atgaaggttc tgtggctgc gttgtggtc acattcctgg caggatgccca ggccaaggtg 120
 gagcaagcgg tggagacaga gccggagccc gagctgcgcc agcagaccga gtggcagagc 180
 ggccagcgtc gggaactggc actgggtcgc ttttgggatt acctgcctg ggtgcagaca 240
 ctgtctgagc aggtgcagga ggagctgctc agctcccagg tcaccagga actgagggcg 300
 ctgatggacg agaccatgaa ggagttgaag gcctacaaat cggaactgga ggaacaactg 360
 accccggtgg cggaggagac gcgggcacgg ctgtccaagg agctgcaggc ggcgcaggcc 420
 cggctggcg cggacatgga ggacgtgtgc ggccgcctgg tgcagtaccg cggcgaggtg 480
 caggccatgc tcggccagag caccgaggag ctgcgggtgc gcctgcctc ccacctgcgc 540
 aagctgcgta agcggctcct ccgcgatgcc gatgacctgc agaagcgctt ggcagtgtac 600
 caggccgggg ccgcgaggg cgccgagcgc ggcctcagcg ccaccgcga gcgcctgggg 660
 ccctgtgtg aacagggcg cgtcggggcc gccactgtgg gctccctggc cggccagccg 720
 ctacaggagc ggcccaggc ctggggcgag cgctgcgcg cgcggatgga ggagatgggc 780
 agccggacc ccgaccgctt ggacgagtg aaggagcagg tggcggaggt gcgcgccaag 840
 ctgaggagc agcccagca gatacgctg caggccgagg ccttccaggc ccgctcaag 900
 agctgttcg agcccctgtt ggaagacatg cagcgccagt gggccgggct ggtggagaag 960
 gtgcaggtg ccgtgggcac cagcgccgcc cctgtgccc gcgacaatca ctgaacgccg 1020
 aagcctgcag ccattgcgac ccacgccacc ccgtgcctcc tgcctccgcg cagcctgcag 1080
 cgggagacc tgtcccgcgc ccagccgtcc tctgggggtg gaccctagtt taataaagat 1140
 tcaccaagtt tcacgc 1156

<;210>; 14

<;211>; 317

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 14

Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys
 1 5 10 15
 Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu
 20 25 30
 Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu
 35 40 45
 Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln
 50 55 60
 Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala
 65 70 75 80
 Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu

	85		90		95										
Glu	Glu	Gln	Leu	Thr	Pro	Val	Ala	Glu	Glu	Thr	Arg	Ala	Arg	Leu	Ser
	100		105		110										
Lys	Glu	Leu	Gln	Ala	Ala	Gln	Ala	Arg	Leu	Gly	Ala	Asp	Met	Glu	Asp
	115		120		125										
Val	Cys	Gly	Arg	Leu	Val	Gln	Tyr	Arg	Gly	Glu	Val	Gln	Ala	Met	Leu
	130		135		140										
Gly	Gln	Ser	Thr	Glu	Glu	Leu	Arg	Val	Arg	Leu	Ala	Ser	His	Leu	Arg
	145		150		155										
Lys	Leu	Arg	Lys	Arg	Leu	Leu	Arg	Asp	Ala	Asp	Asp	Leu	Gln	Lys	Arg
	165		170		175										
Leu	Ala	Val	Tyr	Gln	Ala	Gly	Ala	Arg	Glu	Gly	Ala	Glu	Arg	Gly	Leu
	180		185		190										
Ser	Ala	Ile	Arg	Glu	Arg	Leu	Gly	Pro	Leu	Val	Glu	Gln	Gly	Arg	Val
	195		200		205										
Arg	Ala	Ala	Thr	Val	Gly	Ser	Leu	Ala	Gly	Gln	Pro	Leu	Gln	Glu	Arg
	210		215		220										
Ala	Gln	Ala	Trp	Gly	Glu	Arg	Leu	Arg	Ala	Arg	Met	Glu	Glu	Met	Gly
	225		230		235										
Ser	Arg	Thr	Arg	Asp	Arg	Leu	Asp	Glu	Val	Lys	Glu	Gln	Val	Ala	Glu
	245		250		255										
Val	Arg	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu	Gln	Ala	Gln	Gln	Ile	Arg	Leu	Gln	Ala
	260		265		270										
Glu	Ala	Phe	Gln	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser	Trp	Phe	Glu	Pro	Leu	Val	Glu
	275		280		285										
Asp	Met	Gln	Arg	Gln	Trp	Ala	Gly	Leu	Val	Glu	Lys	Val	Gln	Ala	Ala
	290		295		300										
Val	Gly	Thr	Ser	Ala	Ala	Pro	Val	Pro	Ser	Asp	Asn	His			
	305		310		315										

<;210>; 15

<;211>; 3366

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 15

```

aaaaaaccag gaagtgaagt ccccgagcac gttagaaagc ctgacatggc ctgactcggg 60
acagctcaga gcagggcaga actggggaca ctctgggccg gccttctgcc tgcattggacg 120
ctctgaagcc accctgtctc tggaggaacc acgagcgagg gaagaaggac agggactcgt 180
gtggcaggaa gaactcagag ccgggaagcc cccattcact agaagcactg agagatgcgg 240
ccccctcgca gggcttgaat ttctgtctgc tgttcacaaa gatgettttt atctttaact 300
ttttgttttc ccaacttccg accccggcgt tgatctgcat cctgacattt ggagctgcc 360
tcttctgtg gctgacacc agacctcaac cgtcttacc tcttcttgac ctgaacaatc 420
agtctgtggg aattgaggga ggagcacgga agggggtttc ccagaagaac aatgacctaa 480
caagttgctg cttctcagat gccaagacta tgtatgaggt ttccaaaga ggactcgtg 540
tgtctgacaa tgggcctgc ttggatata gaaacacaaa ccagccctac agatggctat 600
cttacaacaa ggtgtctgat agagcagagt acctgggttc ctgtctcttg cataaaggtt 660
ataaatcatc accagaccag tttgtcgca tctttgtca gaataggcca gattggatca 720
tctccgaatt ggttgttac acgtactcta tgtagctgt acctctgtat gacaccttgg 780
gaccagaagc catctacat attgtcaaca agctgatat cgccatggtg atctgtgaca 840
caccacaaaa ggcattggtg ctgatagga atgtagagaa agccttcacc ccgagcctga 900
aggtgatcat cttatggac cctttgatg atgacctgaa gcaaagaggg gagaagagt 960

```



```

gaattgagat cttatcccta tatgatctg agaacctagg caaagagcac ttcagaaaac 1020
ctgtgcctcc tagcccagaa gacctgagcg tcactgtctt caccagtggg accacaggtg 1080
accccaaaagg agccatgata acccatcaaa atattgtttc aaatgtctgt gcctttctca 1140
aatgtgtgga gcatgcttat gagcccactc ctgatgatgt ggccatatcc tacctccctc 1200
tggtcatat gtttgagagg attgtacagg ctgttggtga cagctgtgga gccagagttg 1260
gattcttcca aggggatatt cggttgctgg ctgacgacat gaagactttg aagcccacat 1320
tgtttccgc ggtgcctcga ctcttaaca ggatctacga taaggtacaa aatgaggcca 1380
agacaccctt gaagaagttc ttgtgaagc tggtgtttc cagtaaattc aaagagcttc 1440
aaaagggtat catcagcagc gatagtttct gggacaagct catctttgca aagatccagg 1500
acagcctggg cgaagggtt cgtgtaattg tcaactggagc tgcccccatg tccacttcag 1560
tcatacatt ctccgggca gcaatgggat gtcagggtga tgaagcttat ggtcaaacag 1620
aatgcacagg tggtgtaca ttacattac ctggggactg gacatcaggt cacgttgggg 1680
tgccccggc ttgaattac gtgaagctgg aagatgtggc tgacatgaac tactttacag 1740
tgaataatga aggagaggtc tgcatcaagg gtacaaacgt gttcaaagga tacctgaagg 1800
accctgagaa gacacaggaa gccctggaca gtgatggctg gcttcacaca ggagacattg 1860
gtcgttggt cccgaatgga actctgaaga tcacgaccg taaaaagaac attttcaagc 1920
tgcccaagg agaatacatt gcaccagaga agatagaaaa tatctacaac aggagtcaac 1980
cagtgttaca aatttttga cacggggaga gcttacggc atccttagta ggagtgtgtg 2040
ttcctgacac agatgtactt cctcatgtt cagccaaget tgggtgaag ggtcctttg 2100
aggaactgtg ccaaaaccaa gttgaaggg aagccatttt agaagacttg cagaaaattg 2160
ggaagaaag tgccctaaa acttttgaac aggtcaaagc ctttttctt catccagagc 2220
cattttccat tgaaaatggg ctcttgacac caacattgaa agcaaagcga ggagagcttt 2280
ccaaatactt tcggacccaa attgacagcc tgtatgagca catccaggat taggataaag 2340
tacttaagta cctgccggc cactgtgac tgcttgtag aaaatggatt aaaaactatt 2400
cttacattt tttgccttt cctctattt tttttaacc tgttaaactc taaagccata 2460
gcttttgtt tatattgaga catataatgt gtaaaactag ttcccaata aatcaatcct 2520
gtctttccca tcttgatgt tgctaatatt aaggttcag ggtactttt atcaaatgc 2580
ctgtcttcaa gatcccagtt tatgttctgt gtccttctc atgatttcca accttaatac 2640
tattagtaac cacaagttca aggtcaaag ggacctctg tgccttctc tttgtttgt 2700
gataaacata acttgccaac agtctctatg cttatttaca tcttctactg tcaactaag 2760
agatttttta attctgaaaa actgcttaca attcatgtt tctagccact ccacaaacca 2820
ctaaaaattht agttttagcc taccatcat gtcaatcata tctatgagac aaatgtctc 2880
gatgtcttc tgcgtaatta aattgtgtac tgaagggaaa agtttgatca taccaaacat 2940
ttcctaaact ctctagttag atatctgact tgggagtata aaaattggc tatgacatat 3000
tgtccaaaag gaatgtgtt cttaaagcat tatttacaga aggaactggg gagtaaatct 3060
gtccctacag tttgtctgt agctgaagc tgtgggggaa ggagttgaca ggtgggcca 3120
gtgaactttt ccagtaaatg aagcaagcac tgaataaaaa cctcctgaac tgggaacaaa 3180
gatctacagg caagcaagat gccacacaa caggttatt tctgtgaag gaaccaactg 3240
atctcccca ccttggtt agagttctg ctctacctt cccacagata acacatgctg 3300
tttctacttg taaatgtaaa gtctttaaaa taaactatta cagatactta aaaaaaaaaa 3360
aaaaaa

```

<210>: 16

<211>: 683

<212>: PRT

<213>: Homo sapiens

<400>: 16

Met Leu Phe Ile Phe Asn Phe Leu Phe Ser Pro Leu Pro Thr Pro Ala

1

5

10

15

Leu Ile Cys Ile Leu Thr Phe Gly Ala Ala Ile Phe Leu Trp Leu Ile

20

25

30

Thr Arg Pro Gln Pro Val Leu Pro Leu Leu Asp Leu Asn Asn Gln Ser
 35 40 45
 Val Gly Ile Glu Gly Gly Ala Arg Lys Gly Val Ser Gln Lys Asn Asn
 50 55 60
 Asp Leu Thr Ser Cys Cys Phe Ser Asp Ala Lys Thr Met Tyr Glu Val
 65 70 75 80
 Phe Gln Arg Gly Leu Ala Val Ser Asp Asn Gly Pro Cys Leu Gly Tyr
 85 90 95
 Arg Lys Pro Asn Gln Pro Tyr Arg Trp Leu Ser Tyr Lys Gln Val Ser
 100 105 110
 Asp Arg Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Cys Leu Leu His Lys Gly Tyr Lys
 115 120 125
 Ser Ser Pro Asp Gln Phe Val Gly Ile Phe Ala Gln Asn Arg Pro Glu
 130 135 140
 Trp Ile Ile Ser Glu Leu Ala Cys Tyr Thr Tyr Ser Met Val Ala Val
 145 150 155 160
 Pro Leu Tyr Asp Thr Leu Gly Pro Glu Ala Ile Val His Ile Val Asn
 165 170 175
 Lys Ala Asp Ile Ala Met Val Ile Cys Asp Thr Pro Gln Lys Ala Leu
 180 185 190
 Val Leu Ile Gly Asn Val Glu Lys Gly Phe Thr Pro Ser Leu Lys Val
 195 200 205
 Ile Ile Leu Met Asp Pro Phe Asp Asp Asp Leu Lys Gln Arg Gly Glu
 210 215 220
 Lys Ser Gly Ile Glu Ile Leu Ser Leu Tyr Asp Ala Glu Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Lys Glu His Phe Arg Lys Pro Val Pro Pro Ser Pro Glu Asp Leu Ser
 245 250 255
 Val Ile Cys Phe Thr Ser Gly Thr Thr Gly Asp Pro Lys Gly Ala Met
 260 265 270
 Ile Thr His Gln Asn Ile Val Ser Asn Ala Ala Ala Phe Leu Lys Cys
 275 280 285
 Val Glu His Ala Tyr Glu Pro Thr Pro Asp Asp Val Ala Ile Ser Tyr
 290 295 300
 Leu Pro Leu Ala His Met Phe Glu Arg Ile Val Gln Ala Val Val Tyr
 305 310 315 320
 Ser Cys Gly Ala Arg Val Gly Phe Phe Gln Gly Asp Ile Arg Leu Leu
 325 330 335
 Ala Asp Asp Met Lys Thr Leu Lys Pro Thr Leu Phe Pro Ala Val Pro
 340 345 350
 Arg Leu Leu Asn Arg Ile Tyr Asp Lys Val Gln Asn Glu Ala Lys Thr
 355 360 365
 Pro Leu Lys Lys Phe Leu Leu Lys Leu Ala Val Ser Ser Lys Phe Lys
 370 375 380
 Glu Leu Gln Lys Gly Ile Ile Arg His Asp Ser Phe Trp Asp Lys Leu
 385 390 395 400
 Ile Phe Ala Lys Ile Gln Asp Ser Leu Gly Gly Arg Val Arg Val Ile
 405 410 415
 Val Thr Gly Ala Ala Pro Met Ser Thr Ser Val Met Thr Phe Phe Arg
 420 425 430

Ala Ala Met Gly Cys Gln Val Tyr Glu Ala Tyr Gly Gln Thr Glu Cys
435 440 445
Thr Gly Gly Cys Thr Phe Thr Leu Pro Gly Asp Trp Thr Ser Gly His
450 455 460
Val Gly Val Pro Leu Ala Cys Asn Tyr Val Lys Leu Glu Asp Val Ala
465 470 475 480
Asp Met Asn Tyr Phe Thr Val Asn Asn Glu Gly Glu Val Cys Ile Lys
485 490 495
Gly Thr Asn Val Phe Lys Gly Tyr Leu Lys Asp Pro Glu Lys Thr Gln
500 505 510
Glu Ala Leu Asp Ser Asp Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Arg
515 520 525
Trp Leu Pro Asn Gly Thr Leu Lys Ile Ile Asp Arg Lys Lys Asn Ile
530 535 540
Phe Lys Leu Ala Gln Gly Glu Tyr Ile Ala Pro Glu Lys Ile Glu Asn
545 550 555 560
Ile Tyr Asn Arg Ser Gln Pro Val Leu Gln Ile Phe Val His Gly Glu
565 570 575
Ser Leu Arg Ser Ser Leu Val Gly Val Val Val Pro Asp Thr Asp Val
580 585 590
Leu Pro Ser Phe Ala Ala Lys Leu Gly Val Lys Gly Ser Phe Glu Glu
595 600 605
Leu Cys Gln Asn Gln Val Val Arg Glu Ala Ile Leu Glu Asp Leu Gln
610 615 620
Lys Ile Gly Lys Glu Ser Gly Leu Lys Thr Phe Glu Gln Val Lys Ala
625 630 635 640
Ile Phe Leu His Pro Glu Pro Phe Ser Ile Glu Asn Gly Leu Leu Thr
645 650 655
Pro Thr Leu Lys Ala Lys Arg Gly Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Arg Thr
660 665 670
Gln Ile Asp Ser Leu Tyr Glu His Ile Gln Asp
675 680

<;210>; 17

<;211>; 1777

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 17

acaggccctt agagcatcgc caggtgcaga gctccacagc tctctttccc aaggagtaat 60
cagagggtga gaacgtggag cctggtggac aggtgaaagc actgggatct ttctgccag 120
aaaggggaaa gttgcacatt tatactctag agggaagcga cagcagtgtc tctccctgtg 180
ctgaggtaca ggagccatgt ggctagaaat cctcctcact tcagtgtctg gctttgccat 240
ctactgttgc atctcccggg acaaagagga aactttgcca cttgaagatg ggtggtgggg 300
gccaggcagc aggtccgcag ccaggagga cgacagcatc cgccctttca aggtggaac 360
gtcagatgag gagatccacg acttacacca gaggatcgat aagtccggtt tcaccccacc 420
tttgaggagc agctgcttcc actatggctt caactccaac tacctgaaga aagtcatttc 480
ctactggcgg aatgaatttg actggaagaa gcaggtggag attctcaaca gataacctca 540
cttcaagact aaaattgaag ggetggacat ccacttcac cactgaagc cccccagct 600
gcccgcaggc cataccccga agcccttgct gatggtgcac ggctggcccc gctctttcta 660
cgagttttat aagatcatcc cactcctgac tgacccaag aaccatggcc tgagcgatga 720
gcagcttttt gaagtcatct gcccttccat ccttgctat ggcttctcag aggcacatc 780

caagaagggg ttcaactcgg tggccaccgc caggatcttt tacaagctga tgctgcgget 840
 ggcttccag gaattctaca ttcaaggagg ggaactggggg tcctgatct gactaatat 900
 ggcccagctg gtgccagcc acgtgaaagg cctgcacttg aacatggctt tggttttaag 960
 caacttctct accctgaccc tctcctggg acagcgttcc gggaggttcc ttggcctcac 1020
 tgagagggat gtggagctgc tgtaccccggt caaggagaag gtattctaca gcctgatgag 1080
 ggagagcggc tacatgcaca tccagtgcac caagcctgac accgtagget ctgctctgaa 1140
 tgactctcct gtgggtctgg ctgcctatat tctagagaag tttccacct ggaccaatac 1200
 ggaattccga tacctggagg atggaggcct ggaaggaag ttctccctgg acgacctgct 1260
 gaccaacgtc atgctctact ggacaacagg caccatcatc tctcccagc gcttctacaa 1320
 ggagaacctg ggacagggct ggaatgacca gaagcatgag cggatgaagg tctatgtgcc 1380
 cactggcttc tctgccttcc cttttgagct attgcacacg cctgaaaagt gggtagagtt 1440
 caagtaccca aagctcatct cctattccta catggttcgt gggggccact ttgcgcctt 1500
 tgaggagccg gagctgctcg cccaggacat ccgcaagttc ctgtcgtgc tggagcggca 1560
 atgaccacc cctctcccc cgctgccac ctccccccac aagtgcctc cagcttttc 1620
 ttggggaaga taccctttt ctgaggaatg agtttgctc cgtccctgc ccatgctggg 1680
 agccacgct caccctca ccctccaag ctactcccc aaccccaac tccgtgtgt 1740
 aagcaacatg gctttgatga taaacgactt tactcta 1777

<;210>; 18

<;211>; 455

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 18

Met Trp Leu Glu Ile Leu Leu Thr Ser Val Leu Gly Phe Ala Ile Tyr

1 5 10 15

Trp Phe Ile Ser Arg Asp Lys Glu Glu Thr Leu Pro Leu Glu Asp Gly

20 25 30

Trp Trp Gly Pro Gly Thr Arg Ser Ala Ala Arg Glu Asp Asp Ser Ile

35 40 45

Arg Pro Phe Lys Val Glu Thr Ser Asp Glu Glu Ile His Asp Leu His

50 55 60

Gln Arg Ile Asp Lys Phe Arg Phe Thr Pro Pro Leu Glu Asp Ser Cys

65 70 75 80

Phe His Tyr Gly Phe Asn Ser Asn Tyr Leu Lys Lys Val Ile Ser Tyr

85 90 95

Trp Arg Asn Glu Phe Asp Trp Lys Lys Gln Val Glu Ile Leu Asn Arg

100 105 110

Tyr Pro His Phe Lys Thr Lys Ile Glu Gly Leu Asp Ile His Phe Ile

115 120 125

His Val Lys Pro Pro Gln Leu Pro Ala Gly His Thr Pro Lys Pro Leu

130 135 140

Leu Met Val His Gly Trp Pro Gly Ser Phe Tyr Glu Phe Tyr Lys Ile

145 150 155 160

Ile Pro Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asn His Gly Leu Ser Asp Glu His

165 170 175

Val Phe Glu Val Ile Cys Pro Ser Ile Pro Gly Tyr Gly Phe Ser Glu

180 185 190

Ala Ser Ser Lys Lys Gly Phe Asn Ser Val Ala Thr Ala Arg Ile Phe

195 200 205

Tyr Lys Leu Met Leu Arg Leu Gly Phe Gln Glu Phe Tyr Ile Gln Gly

210 215 220

Gly Asp Trp Gly Ser Leu Ile Cys Thr Asn Met Ala Gln Leu Val Pro
 225 230 235 240
 Ser His Val Lys Gly Leu His Leu Asn Met Ala Leu Val Leu Ser Asn
 245 250 255
 Phe Ser Thr Leu Thr Leu Leu Gly Gln Arg Phe Gly Arg Phe Leu
 260 265 270
 Gly Leu Thr Glu Arg Asp Val Glu Leu Leu Tyr Pro Val Lys Glu Lys
 275 280 285
 Val Phe Tyr Ser Leu Met Arg Glu Ser Gly Tyr Met His Ile Gln Cys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Asp Thr Val Gly Ser Ala Leu Asn Asp Ser Pro Val Gly
 305 310 315 320
 Leu Ala Ala Tyr Ile Leu Glu Lys Phe Ser Thr Trp Thr Asn Thr Glu
 325 330 335
 Phe Arg Tyr Leu Glu Asp Gly Gly Leu Glu Arg Lys Phe Ser Leu Asp
 340 345 350
 Asp Leu Leu Thr Asn Val Met Leu Tyr Trp Thr Thr Gly Thr Ile Ile
 355 360 365
 Ser Ser Gln Arg Phe Tyr Lys Glu Asn Leu Gly Gln Gly Trp Met Thr
 370 375 380
 Gln Lys His Glu Arg Met Lys Val Tyr Val Pro Thr Gly Phe Ser Ala
 385 390 395 400
 Phe Pro Phe Glu Leu Leu His Thr Pro Glu Lys Trp Val Arg Phe Lys
 405 410 415
 Tyr Pro Lys Leu Ile Ser Tyr Ser Tyr Met Val Arg Gly Gly His Phe
 420 425 430
 Ala Ala Phe Glu Glu Pro Glu Leu Leu Ala Gln Asp Ile Arg Lys Phe
 435 440 445
 Leu Ser Val Leu Glu Arg Gln
 450 455

<;210>; 19

<;211>; 1366

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 19

cgcgagagca ggttaggaga ggagaggagg ccgcagtact gctcacacgc tccgctcttc 60
 tcccaactctc ggcctacctt taccgcgccg cctgctcggc gaccagaaca ccttccacca 120
 tgaccacctc agcaagttcc cacttaaata aaggcatcaa gcagggtgtac atgtccctgc 180
 ctcagggtga gaaagtccag gccatgtata tetggatcga tggtaactgga gaaggactgc 240
 gctgcaagac ccggaccctg gacagtgage ccaagtgtgt ggaagagttg cctgagtgga 300
 atttcgatgg ctccagtact ttacagtctg agggttccaa cagtacatg tatctcgtgc 360
 ctgctgcat gtttcgggac ccttccgta aggacctaa caagctggtg ttatgtgaag 420
 ttttcaagta caatcgaagg cctgcagaga ccaatttgag gcacacctgt aaacggataa 480
 tggacatggt gagcaaccag caccctggt ttggcatgga gcaggagtat accctcatgg 540
 ggacagatgg gcacccttt ggttggcctt ccaacggctt ccaggggccc cagggtccat 600
 attactgtgg tgtgggagca gacagacct atggcaggga catcgtggag gccattacc 660
 gggcctgctt gtatgctgga gtcaagattg cggggactaa tgccgaggtc atgctgccc 720
 agtgggaatt tcagattgga ctttgtgaag gaatcagcat gggagatcat ctctgggtgg 780
 cccgtttcat ctgcatcgt gtgtgtgaag actttggagt gatagcaacc tttgatccta 840
 agcccatcc tgggaactgg aatggtgcag gctgccatac caattcagc accaaggcca 900

tgcgggagga gaatggtctg aagtacatcg aggaggccat tgagaaacta agcaagcggc 960
 accagtacca catccgtgcc tatgatccca aggaggcct ggacaatgcc cgacgtctaa 1020
 ctggattcca tgaacctcc aacatcaacg acttttctgg tgggttagcc aatcgtagcg 1080
 ccagcatatcg cattccccgg actgttgccc aggagaagaa gggttacttt gaagatcgtc 1140
 gcccctctgc caactgcgac cccttttcgg tgacagaagc cctcatccgc acgtgtcttc 1200
 tcaatgaaac cggcgatgag cccttcagc acaaaaatta agtggactag acctccagct 1260
 gttgagcccc tctagttct tcatccact ccaactcttc ccctctccc agttgtcccg 1320
 attgtaactc aaagggtgga atatcaaggt cgtttttttt cattcc 1366

<;210>; 20

<;211>; 373

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;400>; 20

Met Thr Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Val
 1 5 10 15
 Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
 20 25 30
 Ile Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
 35 40 45
 Ser Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
 50 55 60
 Ser Ser Thr Leu Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Val
 65 70 75 80
 Pro Ala Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
 85 90 95
 Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Arg Pro Ala Glu Thr Asn
 100 105 110
 Leu Arg His Thr Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
 115 120 125
 Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
 130 135 140
 His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro
 145 150 155 160
 Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Arg Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val
 165 170 175
 Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Ala Gly
 180 185 190
 Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro
 195 200 205
 Cys Glu Gly Ile Ser Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala Arg Phe Ile
 210 215 220
 Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
 245 250 255
 Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Tyr Ile Glu Glu
 260 265 270
 Ala Ile Glu Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
 275 280 285
 Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His

【図面の簡単な説明】
【図1】 関節軟骨病変の病理組織学的評価基準を示す図

【 図 1 】

関節軟骨病変の病理組織学的評価基準

I. Structure (構造)

Normal	0 ^{a)}	Cleft in calcified zone	6
Slight surface irregularities	1	Loss of transitional zone	7
Moderate surface irregularities	2	Loss of radial zone	8
Severe surface irregularities	3	Loss of calcified zone	9
Cleft in transitional zone	4	Complete disorganization	10
Cleft in radial zone	5		

II. Cell (細胞)

1. Tangential zone (浅在帯)

Normal	0 ^{a)}	Disappearance of cells	2
Swelling of cells	1		

2. Transitional and Radial zone (中間帯及び深在帯)

Normal	0 ^{a)}	Severe cloning	6
Slight hypercellularity	1	Slight hypocellularity	7
Moderate hypercellularity	2	Moderate hypocellularity	8
Severe hypercellularity	3	Severe hypocellularity	9
Slight cloning	4	Disappearance of cells	10
Moderate cloning	5		

III. Safranin O staining (サフラニン O 染色性)

Normal	0 ^{a)}	Severe reduction	3
Slight reduction	1	No dye noted	4
Moderate reduction	2		

IV. Tidemark (タイドマーク)

Intact	0 ^{a)}	Indistinct	2
Multilayered	1	Crossed by blood vessels	3

V. Pannus Formation (パヌス形成)

None	0 ^{a)}	Moderate	2
Slight	1	Marked	3

a) 評点, 病変の程度を示す。I ~ Vの最大合計評点は 32 点。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/50
33/53

識別記号

F I

G 0 1 N 33/53
C 0 7 K 16/18

シーコード (参考)

D

// C07K 16/18

C12N 15/00

ZNAA

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CA25
CB01 DA12 DA13 DA14 DA20
DA36 DA77 FB01 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 HA12
HA15
4B063 QA19 QQ53 QQ79 QQ96 QR08
QR32 QR42 QR55 QR62 QS25
QS33 QS34 QX01
4C084 AA16 BA44 NA14 ZA96
4H045 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50
EA60 FA74